



Squelette membranaire chez *Paramecium Tetraurelia* : analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigénique des épiplasmines

Raghida Damaj

► To cite this version:

Raghida Damaj. Squelette membranaire chez *Paramecium Tetraurelia* : analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigénique des épiplasmines. Biologie cellulaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT : 2008CLF21869 . tel-00731002

HAL Id: tel-00731002

<https://theses.hal.science/tel-00731002>

Submitted on 11 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

(U.F.R.Sciences et Technologies)

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
N°X

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : Biologie, Physiologie et Génétique Moléculaire

Par

Raghida DAMAJ

Diplômée d'Études Approfondies de Biologie Cellulaire et moléculaire (Strasbourg)

**Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* :
Analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigénique des
épiplasmines**

Soutenue publiquement le 30 Octobre 2008, devant la commission d'examen :

Président : **Jacques BOHATIER**
Professeur, Université d'Auvergne

Rapporteurs : **Linda SPERLING**
Directrice de recherche CNRS, CGM, Gif-sur-Yvette
Eric VISCOGLIOSI
Chargé de recherche CNRS, HDR, Institut Pasteur, Lille
Robert PECK
Professeur, Université de Genève

Examineurs : **Anne FLEURY-AUBUSSON**
Chargée de Recherche CNRS, Université Paris XI
Frédéric DELBAC
Professeur, Université Blaise Pascal
Philippe BOUCHARD
Maître des conférences, Université Blaise Pascal
Bernard VIGUES
Chargé de Recherche CNRS, HDR, Université Blaise Pascal

Remerciements

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Amblard de m'avoir accueillie au sein du laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer cette thèse.

Merci à Jacques Bohatier de bien vouloir présider ce jury. A Linda Sperling, Robert Peck et Eric Viscogliosi d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt porté à ce travail.

Merci à Frédéric Delbac pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Un grand merci à Anne Fleury pour sa collaboration aux expériences de microinjection, pour la qualité de sa collaboration, ses nombreux conseils, son aide constante et pour la façon efficace et amicale avec laquelle elle a suivi ce travail et pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de l'examiner.

Mon immense reconnaissance au groupe GDRE de nous avoir permis d'accéder aux données du génome de la paramécie.

Merci à Jean Cohen pour ses conseils, ses idées judicieuses qui nous ont aidés dans l'aboutissement de cette thèse.

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire des Microorganismes : Génome et Environnement à l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II) et il a été encadré par Philippe Bouchard. Je lui exprime ma profonde gratitude pour m'avoir encadrée tout au long de ces trois années, m'avoir guidée et m'avoir fait bénéficier de son expérience et également pour la confiance qu'il m'a accordée ainsi que pour ses conseils.

Je tiens à remercier Bernard Viguès, pour son soutien humain et moral, le lui exprime tout mon respect.

Un grand merci et toutes mes reconnaissances à Geneviève et Gérard, je leur exprime toute ma gratitude. Merci pour vos précieux conseils, vos disponibilités, votre confiance et votre investissement personnel dans l'aboutissement de cette thèse. Veuillez trouver les marques de ma reconnaissance et de mon respect.

Merci Geneviève premièrement pour la collaboration technique à ce travail (les expériences d'immunofluorescence et le clonage) et deuxièmement pour votre aide personnelle et humaine.

Merci Gérard pour votre disponibilité, votre expérience, les discussions scientifiques et vos grandes compétences qui ont permis l'accomplissement de cette thèse.

Merci à l'ensemble de l'équipe pédagogique avec qui j'ai acquis mes expériences d'enseignante (Olivier Bardot, Marie-Thérèse et Marie-Claude).

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont toujours soutenue et aidée pendant toutes ces années: Florence Donnadiou, Agnès Vellet et Viviane Ravet. Merci Florence et Agnès pour le support technique et vos doigts de fées et votre soutien moral.

Et puis il y a les proches et les amis, à vous tous merci, je remercie Abdallah pour son encouragement durant ces trois années et son soutien moral.

Merci à ceux qui m'ont soutenu et encouragé: Rodaina, Fatma, Zeinab, Nada et tous mes amis.

Enfin, je ne peux manquer de rappeler mon immense et éternelle reconnaissance à ma famille (KAMAL, NAZEK, NAWAL, ZIAD, RABIH, MAHMOUD et HIBA), qui sacrifient toujours et que je leur exprime toute ma gratitude et je les remercie de tout mon cœur pour leur tendre soutien moral, je leur dédie ce travail car ce sont eux qui m'ont permis d'atteindre ce niveau d'études et cet aboutissement personnel.

Table des matières

Liste des Figures	4
Résumé	7
Abstract	8
Introduction Générale	10
Chapitre I : Cytosquelette des cellules des métazoaires	15
I. Principaux réseaux cytosquelettiques : protéines constitutives.....	15
I.1. Les microtubules	15
I.2. Les filaments intermédiaires (IF)	16
I.2.a. Histoire des lamines	18
I.2.b. Rôle des lamines dans la régulation de la mécanique nucléaire	20
• Implication des lamines de type A/C.....	20
• Implication des lamines de type B	21
• Synergie entre les différentes formes des lamines.....	22
I.2.c. Rôle des lamines dans l'organisation des pores nucléaires	23
I.2.d. La lamina comme un élément de tenségrité pour le noyau	23
I.3. Les microfilaments	25
• L'actine	25
I.4. Interaction des éléments du cytosquelette	25
II. Conclusion	26
Chapitre II : Présentation de la Paramécie.....	28
I. Présentation générale	28
II. Dimorphisme nucléaire et cycle de vie	30
III. Le génome de la paramécie	30
Chapitre III : Le cytosquelette cortical chez les Protistes Ciliés	32
I. Les composants du cytosquelette cortical	34
I.1. Les systèmes microtubulaires chez <i>Tetrahymena</i> et <i>Paramecium</i>	34
I.2. Le système de microfilaments :.....	36
I.3. Le réseau d'épiplasme chez Euglènes, <i>Pseudomicrothorax</i> , Euplotes, <i>Tetrahymena</i> et <i>Paramecium</i>	37
I.3.a. L'épiplasme chez les euglènes : une structure majoritairement composée d'articulines	37

I.3.b. L'épiplasme chez <i>Pseudomicrothorax</i> : une structure majoritairement composée d'articulines	38
I.3.c. L'épiplasme chez les euplotes : une structure composée de protéines homologues aux articulines	40
I.3.d. L'épiplasme chez <i>Tetrahymena</i>	41
I.3.e. L'épiplasme chez <i>Paramecium</i>	43
I.4. Les réseaux de centrines chez <i>Tetrahymena et Paramecium</i>	46
I.5. Morphogenèse Chez <i>Paramecium</i>	48
Chapitre IV : Familles Multigéniques	52
I. La notion de familles multigéniques	53
II. Duplication « small-scale » versus duplication « large scale »	53
III. Etude des familles multigéniques chez <i>Paramecium tetraurelia</i>	54
III.1. Etude de la famille multigénique des centrines	54
III.2. Etude fonctionnelle de la famille multigénique des striatines	59
III. Etude de la famille multigénique des actines	60
III.4. Etude de la famille multigénique des tubulines	63
IV. Conclusion	65
Résultats Expérimentaux	66
Chapitre I : Analyse structurale de la famille multigénique des Epiplasmines	67
I. But du travail	68
II. Etude structurale de la famille multigénique des épiplasmines	68
II.1. Mise à jour du cladogramme de la famille multigénique des épiplasmines	69
II.2. La méthode HCA « Hydrophobic Cluster Analysis » utilisée pour étudier les structures des épiplasmines	72
II.3. Recherche des protéines contenant des domaines apparentés aux épiplasmines	78
II.4. Comparaison des épiplasmines de la paramécie avec leurs orthologues chez <i>Tetrahymena</i>	79
II.5. La famille multigénique des épiplasmines et le niveau d'expression de ses membres. Détection d'éléments promoteurs putatifs :	81
III. Conclusion	84
Chapitre II: Analyse fonctionnelle de la famille multigénique des Epiplasmines	87
I. Introduction	87
II. Analyse détaillée de la famille multigénique des épiplasmines	88
II.1. Outils d'analyse fonctionnelle chez la Paramécie	88
II.2. RNAi des représentants des Epiplasmines	90

II.2.1.	Effets du RNAi des épiplasmines symétriques	92
II.2.2.	Effets du RNAi des épiplasmines asymétriques	98
II.2.3	Effets du RNAi des épiplasmines atypiques: sans géométrie définie	103
•	Conclusion	104
II.3.	Localisations des épiplasmines	105
II.3.1.	Localisation des épiplasmines symétriques (groupe 1) fusionnées à la GFP	106
II.3.2.	Localisation des épiplasmines asymétriques fusionnées à la GFP	106
II.3.3.	Localisation des épiplasmines Atypiques fusionnées à la GFP.....	107
II.3.4.	Localisation des épiplasmines des autres groupes symétriques (groupes 3 et 5) fusionnées à la GFP	110
II.3.5.	Localisation de l'épiplasmine asymétrique de <i>Tetrahymena</i> fusionnée à la GFP: L'EpiTetra 2.....	112
II.3.6.	Localisation de l'Epi 38 fusionnée à la GFP	113
II.3.7.	Effets de la surexpression des épiplasmines fusionnées à la GFP.....	114
	Discussion générale et perspectives	121
I.	Epiplasmines : une famille multigénique large et interspécifique.	121
II.	Histoire d'épiplasme, histoire des génomes	122
III.	Eléments de comparaison avec les filaments intermédiaires.....	126
IV.	Un modèle constituant l'épiplasme chez la paramécie	127
V.	Rôle des épiplasmines.....	132
V.I.	L'épiplasme : une structure de tenségrité ?	132
V.II.	Cas des épiplasmines chez <i>Tetrahymena</i>	134
VI.	Vers un modèle de bipartition de l'écaille épiplasmique.....	136
VII.	Element de liaison : cinétosome/épiplasme	138
VIII.	Reconsidérations techniques	138
	Matériels et Méthodes :.....	141
A-	Cultures cellulaires :	141
B-	Analyse des séquences nucléiques et protéiques.....	141
C-	Clonage des ADN et séquençage.....	141
D-	Le RNAi médié par le feeding	142
E-	Microscopie	142
F-	GFP et Injections.....	142
	Références Bibliographiques.....	145
	Annexes	156

Liste des Figures

Fig.1 : structure générale des filaments intermédiaires cytoplasmiques comparée à celle des lamines.

Fig.2 : Modèle proposant la liaison entre la lamina et l'actine du cytosquelette.

Fig. 3 : Présentation de la paramécie.

Fig.4 : Représentation schématique des principales structures corticales chez les ciliés.

Fig.5 : Vue d'une paramécie en microscopie électronique à balayage.

Fig.6 : Représentation tridimensionnelle du cortex de *Paramecium*.

Fig. 7: Ultrastructure d'un corps basal.

Fig.8: Les corps basaux sont entourés de 3 types d'appendices distincts.

Fig.9 : Représentation schématique d'une coupe longitudinale du cortex des Euglènes.

Fig.10 : Structure des articulines.

Fig.11 : Observations en microscopie électronique à balayage du squelette membranaire de *Pseudomicrothorax* (A) et vu de l'intérieur de la cellule (B).

Fig.12 : Modèle d'architecture moléculaire des platéines (haut) et des articulines d'*Euglena* et de *Pseudomicrothorax* (bas).

Fig.13 : Organisation de la surface et du cortex de *Tetrahymena*.

Fig.14: Représentation schématique des domaines répétés de l'EpiC.

Fig.15 : Représentation graphique de la structure des épiplasmines.

Fig. 16: A- Immunofluorescence de l'épiplasme chez la paramécie à l'aide de l'anticorps CTS-32, un anticorps monoclonal qui reconnaît toutes les épiplasmines de la paramécie.
B- Immunofluorescence de l'outer lattice chez la paramécie en utilisant l'anticorps CC212.

Fig.17 : Événements de morphogenèse corticale chez la paramécie.

Fig.18 : Représentation schématique des zones corticales chez la paramécie.

Fig.4 : Représentation schématique des principales structures corticales chez les ciliés.

Fig.19 : différentes localisations des centrines fusionnées à la GFP.

Fig.20 : Les effets de la délétion des centrines semblent être spécifique pour chaque sous famille.

Fig.21 : Effets de la déplétion d'Icl1ep par le mécanisme de RNAi.

Fig.22 : La localisation par GFP des membres de la sous famille 1 d'actine.

Fig.23 : Phénotypes obtenus avec les cellules subissant le RNAi d'act4, act7 et act9 respectivement.

Fig. 24 : Analyse comparative des épiplasmines de *Paramecium tetraurelia* et de *Tetrahymena thermophila* en utilisant l'alignement des séquences d'ADN.

Fig.25 : Représentation en HCA des épiplasmines des sous-groupes 1a et 1b.

Fig.26 : Représentation en HCA des épiplasmines des sous-groupes 2a et 2b.

Fig.27 : Représentation en HCA des épiplasmines du groupe 3.

Fig.28: Représentation en HCA des sous-groupes 4a et 4b.

Fig.29 : Représentation en HCA des épiplasmines des sous-groupes 5a et 5b.

Fig.30 : Organisation modulaire des épiplasmines de *P. tetraurelia* en utilisant la représentation des GCA « Generalized Cluster Analysis ».

Fig.31 : Comparaison structurale des 2 représentants des sous-groupes 1a et 1b en utilisant la méthode HCA.

Fig.32 : Organisation Modulaire du domaine central des épiplasmines.

Fig.33: Représentation en HCA des Tetra2829, Para21655 et de Para23342.

Fig.34 : Evidence de la présence des domaines structuraux communs entre les épiplasmines de *P.tetraurelia* et leurs orthologues (EpiT) chez *T.thermophila*.

Fig.35 : Analyse des régions 5'UTR des gènes d'épiplasmines de *P.tetraurelia*.

Fig. 36 : Effets du RNAi des épiplasmines symétriques sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32.

Fig.37 : Effets du RNAi des épiplasmines symétriques sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32.

Fig.38 : Altérations au niveau local observées avec le RNAi de l'Epi 23 et de l'Epi 41.

Fig. 39 : Effets du RNAi de l'épiplasmine symétrique Epi 46 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32.

Fig. 40 : Effets du RNAi de l'épiplasmine asymétrique Epi 2 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32.

Fig. 41 : Effets du RNAi de l'épiplasmine asymétrique Epi 18 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32.

Fig. 42 : Effets du RNAi de l'épiplasmine asymétrique Epi 20 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32.

Fig. 43 : Altérations au niveau local suite au RNAi des épiplasmines asymétriques.

Fig. 44 : Effets du RNAi de l'épiplasmine asymétrique Epi 38 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32.

Fig. 45 : Effets du RNAi des épiplasmines Atypiques.

Fig.46: Localisation de l'Epi 41 dans *P.tetraurelia*.

Fig.47: Localisation de l'Epi 20 dans *P.tetraurelia*.

Fig.48 : localisation de l'Epi 11 dans *P.tetraurelia*.

Fig.49 : Localisation de l'Epi 40 dans *P.tetraurelia*.

Fig.50 : Localisation de l'Epi 43 dans *P.tetraurelia*.

Fig.51 : Localisation de l'Epi 30 dans *P. tetraurelia*.

Fig.52 : Localisation de l'Epi 51 dans *P.tetraurelia*.

Fig. 53: Localisation de l'Epitetra2 dans *P.tetraurelia*.

Fig.54: Localisation de l'Epi 38 dans *P.tetraurelia*.

Fig. 55 : Effets de la surexpression de l'Epi 20-GFP.

Fig.56: Effet de la surexpression de l'Epi 38-GFP.

**Fig.57 : Modèle centrifuge de la constitution d'une écaille chez la paramécie :
Microscopie électronique et schématisation d'une section transversale du cortex.**

Résumé

Le cortex de la plupart des protistes ciliés contient un squelette membranaire dont le principal élément est l'épiplasma, une structure apposée à la membrane alvéolaire interne. Chez la paramécie, l'épiplasma se présente sous forme d'écailles indépendantes disposées autour de chaque appareil ciliaire ; il est composé d'une famille multigénique de protéines appelées épiplasmines.

Nous avons réalisé une étude structurale de cette famille multigénique. L'analyse phylogénétique a permis de confirmer l'existence de 5 groupes d'épiplasmines divisé chacun en deux sous-groupes a et b. L'utilisation de la méthodologie HCA nous a permis de montrer que ces protéines sont modulaires et présentent un arrangement de leurs domaines structuraux. Elles peuvent ainsi être regroupées en trois classes symétriques, asymétriques et atypiques. L'analyse des régions 5'UTR des membres de cette famille multigénique montre la présence d'éléments putatifs de régulation d'expression.

La comparaison des épiplasmines de la paramécie avec leurs orthologues de *Tetrahymena* montre une relation structurale entre les groupes 1, 2, 3, et 5 et les EpiT1, 2, 3 et 5 respectivement, suggérant l'existence d'un ancêtre commun pour l'épiplasma de *Paramecium* et *Tetrahymena*.

Nous avons réalisé l'analyse fonctionnelle des épiplasmines à partir d'approche par ARN interférence et par localisation couplée à la GFP. La perturbation de l'expression des épiplasmines symétriques et asymétriques, aboutit à une réponse cellulaire commune qui se traduit par un changement de la forme cellulaire, un blocage de la cytokinèse et enfin l'apparition de formes plasmodiales. L'analyse du cortex par microscopie à fluorescence montre une altération des unités corticales qui est fonction des types structuraux des épiplasmines.

Les épiplasmines se localisent de manière différentielle autour du corps basal définissant un territoire dont le modèle d'organisation est centrifuge. On définit alors des épiplasmines cinétosomales, péricinétosomales, core et enfin périphériques. Ce modèle est discuté en relation avec les phénotypes obtenus par l'analyse fonctionnelle. Il permet d'intégrer les différents niveaux de relation entre le corps basal, son territoire et l'ensemble de l'épiplasma.

Abstract

Cortex in most ciliate protozoan contains a membrane skeleton mainly composed of epiplasm, a layer closely apposed to the inner alveolar membrane. In *Paramecium*, this layer is segmented into independent scales centered on each ciliary apparatus; the epiplasm is composed by a multigenic family of protein called epiplasmins.

We performed a structural analysis of this multigenic family. Phylogenetic analysis supports a clustering of epiplasmins in 5 groups, each of them subdivided in 2 sub-groups a and b. Using HCA method, we show that these proteins are modular, and that they present various arrangements of their structural domains. Epiplasmins can be regrouped into three classes symmetrical, asymmetrical, and atypical. Analysis of the 5'UTR sequences shows that putative expression regulative elements are present in most of the members of this multigenic family.

Comparison of *Paramecium* epiplasmins with their orthologs in *Tetrahymena* shows a structural relationship between groups 1, 2, 3, and 5 and EpiT1, 2, 3, and 5, respectively, suggesting that both epiplasms evolved from a common ancestor.

We present a functional analysis of epiplasmins, using RNA interference and GFP-labeled epiplasmins. Decreasing the expression of symmetrical and asymmetrical epiplasmins induces a common cellular response: change in rounded pear-shaped cells and cytokinesis blockage leading to a 'Boomerang' cell shape, later followed by plasmodial forms. Analysis of cortex by fluorescence microscopy shows that the alteration of cortical units using various RNAi conditions depends on the epiplasmin structural type.

Expression of GFP-epiplasmins shows that these proteins are differentially localized around the basal body, defining a territory which conforms to a centrifugal organization model. Epiplasmins are thus defined as kinetosomal, peri-kinetosomal, core, and peripheral. We discuss this model in relation to the phenotypes we obtained from functional analysis. This model provides a way to integrate the different levels of relationship between the basal body, its territory, and the epiplasm in its entirety.

Introduction générale

Introduction Générale

Nous ne pouvons pas parler de squelette sans citer le cytosquelette des cellules. Toute cellule Eucaryote, animale ou végétale, possède des molécules dont le rôle est de contrôler la mobilité des organites et de la cellule elle-même, ainsi que de donner une forme spécifique à celle-ci pouvant améliorer sa fonction.

Le squelette est nécessaire au maintien et à la protection de l'organisme. Même la cellule, la plus simple des êtres vivants, est dotée d'un cytosquelette qui lui permet de réguler sa forme et son anatomie. Certaines espèces aquatiques, comme la méduse, ont un hydrosquelette. Il s'agit d'une poche qui se remplit d'eau au niveau de la bouche et permet ainsi de maintenir la forme de l'organisme. Les insectes, comme la blatte, ont un squelette externe très solide qui leur confère leur forme, l'exosquelette. Il est constitué d'une cuticule qui couvre et imperméabilise l'épiderme. Chez les vertébrés, le squelette est interne et couvert de tissus vivants. Cet endosquelette est composé de pièces plus ou moins solides, comme les os, les cartilages et les tendons, liées pour former la structure de soutien. Le squelette est adapté à la morphologie et au mode de vie de l'animal. Par exemple, le crocodile et le poisson ont ainsi un corps longiligne et fin et une queue développée adaptés à la vie aquatique. Enfin, nous constatons que les propriétés mécaniques du cytosquelette sont très variables suivant les situations environnementales considérées.

Récemment la présence d'un cytosquelette chez les procaryotes a été mise en évidence. A été découverte la protéine MreB, homologue à la protéine d'actine, et de structure similaire, localisée sous la membrane et semblant jouer un rôle important dans la structure et la forme cellulaire. De même, a été identifiée la protéine FtsZ qui jouerait également un rôle dans la cytodivision des bactéries.

Le cytosquelette chez les eucaryotes est formé de trois grands types de réseaux filamenteux. Les différents types d'éléments cytosquelettiques diffèrent par leur diamètre et leurs constituants. Les microtubules ont un diamètre de 25 nm, le diamètre des filaments d'actine est de 5nm, enfin les filaments intermédiaires ont un diamètre moyen de 10 nm.

Le cytosquelette assure une certaine rigidité à la cellule et sert à la fixation des organites. Le cytosquelette se réorganise en permanence c'est-à-dire que, pendant qu'une structure est détruite, une autre se crée. Il gouverne les mouvements internes dans la cellule tels que le

déplacement des chromosomes et des organites cellulaires comme les mitochondries ou le noyau. De même, le cytosquelette gouverne les déformations de la membrane cellulaire.

Le cytosquelette comprend aussi le squelette membranaire qui permet d'entretenir les liens avec la membrane qu'il supporte. A noter que la membrane nucléaire est charpentée par une organisation cytosquelettique composée par les lamines. Donc, une membrane est toujours soutenue par le cytosquelette. Les interactions cytosquelette-membrane contribuent à l'édification et à la stabilisation de la morphologie cellulaire.

Chez le protiste cilié qu'est la paramécie, la membrane plasmique (MP) est sous-tendue par un cortex protéique plurilaminaire compartimenté en unités organisées autour des cils. Chaque unité corticale comprend une alvéole constituée de deux membranes, une externe sous la MP, une interne en contact direct avec l'épiplasma cortical sous-jacent. Après chaque division, la morphologie cellulaire est fidèlement reproduite par duplication ou réassemblage des différents réseaux corticaux.

Les épiplasmines sont les protéines constitutives du squelette sous-membranaire (épiplasma) chez la paramécie. Ces épiplasmines forment une famille multigénique dont la signature est un domaine de 79 acides aminés flanqué de deux régions variables riches en résidus Q, P et V. Notre travail se situe dans la continuité des travaux précédents au laboratoire sur ces épiplasmines ayant montré un rôle pour une d'elles lors du processus de morphogenèse corticale (Epi2). Une question qui se pose est de savoir le rôle de ces molécules et de comprendre leur mécanisme d'action. Ce travail a été facilité par les outils de génétiques inverse développés chez la paramécie.

Dans la première partie de ce manuscrit, on fera une revue bibliographique sur les principaux réseaux cytosquelettiques chez les métazoaires, les différentes fonctions cellulaires dans lesquelles elles sont impliquées. On présentera ensuite les caractéristiques principales de la paramécie ainsi que les composants du cytosquelette cortical chez les protistes ciliés. On terminera cette première partie par les familles multigéniques, on parlera de la notion de ces dernières et leur étude chez *Paramecium tetraurelia*. Les résultats obtenus au cours de cette thèse seront présentés en deux chapitres : dans le premier, on parlera de l'analyse structurale de la famille multigénique des Epiplasmines et dans le deuxième on parlera de l'analyse fonctionnelle de cette dernière.

On finira par une discussion générale où nous tentons d'interpréter les résultats qu'on a obtenus et on proposera des perspectives pour envisager la suite du travail qu'on a effectué.

Analyse Bibliographique

Chapitre I

Cytosquelette des cellules des métazoaires

Chapitre I : Cytosquelette des cellules des métazoaires

Le cytoplasme d'une cellule est un ensemble fortement structuré. Il est traversé d'une matrice protéique fibreuse entre le noyau et la surface interne de la membrane plasmique. Le cytosquelette est constitué de polymères biologiques de protéines, qu'on qualifie parfois de fibres étant donné leur taille importante à l'échelle cellulaire. Chez les métazoaires, les filaments intermédiaires avec les filaments d'actine et les microtubules, composent le cytosquelette.

Cette charpente va interagir avec les autres composants de la cellule, comme la membrane plasmique, limite la plus externe de la cellule, mais aussi les organites, y compris la structure du noyau. Le cytosquelette a donc un champ d'interaction très vaste qui va concerner tous les compartiments de la cellule.

Ce réseau formé par ces trois types de filaments et de leurs protéines associées est responsable de l'intégrité mécanique de la cellule et il est impliqué dans des processus tels que la division cellulaire, la motilité et la plasticité.

I. Principaux réseaux cytosquelettiques : protéines constitutives

I.1. Les microtubules

Les microtubules sont des polymères d' α - et de β - tubuline en forme de tube rigide de 25nm de diamètre. Les dimères formés par l'association en tête à queue des sous unités α et β s'assemblent pour former un protofilament dont la croissance est polarisée : l'extrémité qui croît le plus rapidement est appelée extrémité (+), l'autre étant l'extrémité (-). Les microtubules sont formés de 13 protofilaments parallèles disposés autour d'un cylindre central creux.

Les tubulines α et β , composants majeurs des microtubules, sont des protéines d'environ 50 kDa remarquablement conservées au cours de l'évolution. Cependant, la diversité des isoformes α et β varie considérablement suivant les espèces. L'espèce humaine possède 15 gènes d' α -tubuline et 21 gènes de β -tubuline alors que la plupart des organismes unicellulaires comme la levure n'en possèdent qu'un ou deux exemplaires. Dans la plupart des cellules eucaryotes, l'hétérogénéité des tubulines est liée aux modifications post-

traductionnelles comme l'acétylation, la polyglycylation, la polyglutamylation, la tyrosination/détorysination, la phosphorylation et la palmitoylation.

Certaines de ces modifications postraductionnelles sont associées à des changements de stabilité des microtubules et leur donnent une polyvalence fonctionnelle. Ainsi, les microtubules riches en tubuline détyrosinée et acétylée sont plus stables et résistent à la dépolymérisation par le nocodazole.

Comme les flagelles et les cils des cellules eucaryotes sont constitués d'une armature axiale composée d'un cylindre de 9 doublets de microtubules partiellement fusionnés et d'un doublet central, c'est par la flexion de leur faisceau de microtubules que les cils et flagelles peuvent se mouvoir, donc ces microtubules jouent un rôle dans le battement ciliaire.

Les microtubules et leurs protéines motrices jouent un rôle essentiel dans la séparation des chromosomes pendant la mitose, ainsi la charpente des microtubules présente pendant l'interphase se désagrége et les tubulines libérées se réorganisent pour former le fuseau mitotique. De même, les microtubules ont d'autres rôles dans la diapédèse et le transport de vésicules d'endocytose et d'exocytose. Ils permettent d'acheminer divers composants vers leurs extrémités, servant de véritables rails sur lesquels des moteurs moléculaires, attachés aux composants à transporter, se déplacent.

De même, elles sont localisées dans des compartiments cellulaires très variés. Les microtubules sont très nombreux dans les neurones, en particulier dans les dendrites et les axones, ils composent majoritairement le filament axial flagellaire des cellules eucaryotes mobiles comme les spermatozoïdes matures.

En conclusion, les microtubules sont un composant essentiel du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle central dans de multiples fonctions comme la division cellulaire, les trafics intracellulaires et la morphogenèse cellulaire.

I.2. Les filaments intermédiaires (IF)

La dénomination « filaments intermédiaires » est issue de leur diamètre d'environ 10 nm qui est intermédiaire entre celui des microtubules (25 nm) et celui des microfilaments (4 à 7 nm). Les IF sont des polymères flexibles fournissant aux cellules un support capable de résister aux stress mécaniques.

Les protéines des filaments intermédiaires sont exprimées dans toutes les cellules de métazoaires où elles forment une partie du cytosquelette, mais elles sont absentes chez les plantes et les champignons (Fuchs and Weber 1994; Herrmann and Aebi 2000).

Les protéines des filaments intermédiaires ont une structure secondaire commune formée d'un domaine central de 310 à 350 acides aminés flanqué de deux domaines N- et C-terminaux de tailles variables conférant à chaque filament des caractéristiques biochimiques distinctes.

Chez les vertébrés, plus de 50 gènes ont été répertoriés et regroupés en 6 classes (seule la classe V représente des IF nucléaires, les autres sont cytoplasmiques) :

Les membres des classes I et II sont respectivement des kératines acides et basiques exprimées dans les cellules épithéliales. Seuls des hétéropolymères entre les protéines de classe I et II peuvent être formés.

Les membres de la famille III, incluant la vimentine, la desmine, la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et la périphérine, forment des homopolymères. Ces protéines sont présentes dans de nombreux types cellulaires : cellules mésenchymateuses pendant le développement précoce (vimentine), les cellules musculaires (desmine), les cellules gliales et astrocytaires (GFAP) et les cellules neuronales (périphérine).

Les membres de la classe IV, incluant les neurofilaments formés de trois sous-unités (NF-L, NF-M et NF-H) et l' α -internexine, forment des homopolymères.

Les lamines A, B1, B2 et C constituent la classe V des IF et composent la lamina nucléaire des cellules eucaryotes.

La classe VI correspond à la nestine. En raison de la structure de son gène, la nestine peut aussi être regroupée avec les neurofilaments dans la classe IV. Pendant l'embryogenèse, la nestine est exprimée dans les cellules en prolifération et en migration.

Les IF orphelins ou non-classés tels que la phakinine et la filensine qui sont exprimées dans le cristallin.

Les filaments intermédiaires ont des localisations multiples et jouent un rôle intégrateur de l'espace cellulaire. Parmi ces filaments, les lamines forment le cytosquelette sous-membranaire nucléaire et elles semblent être l'ancêtre de ces filaments (Hutchison and Worman 2004).

Nous procédons à un rappel des principales données de la littérature concernant la structure des lamines et leurs fonctions présumées.

I.2.a. Histoire des lamines

Les filaments intermédiaires confèrent une stabilité mécanique aux cellules quand elles sont exposées au stress mécanique et agissent comme support quand les autres filaments cytosquelettiques ne peuvent pas assurer l'intégrité des cellules, surtout au moment de la migration cellulaire et particulièrement durant la guérison des blessures (Wong and Coulombe 2003).

Les lamines ont une structure comparable avec celle des filaments intermédiaires cytoplasmiques (fig.1).

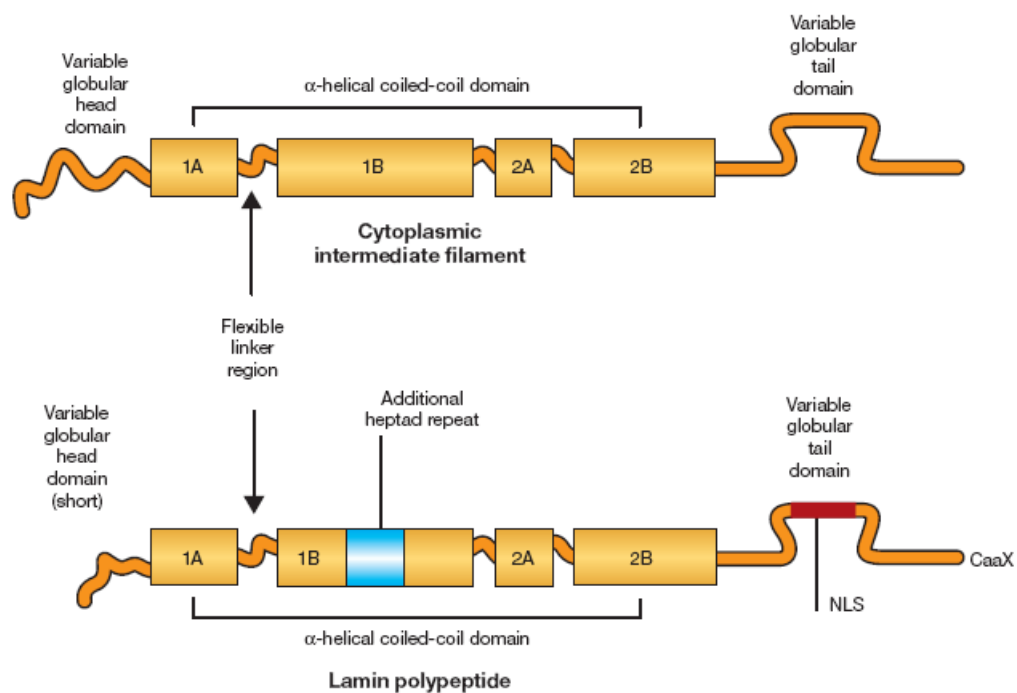


Fig.1 : structure générale des filaments intermédiaires cytoplasmiques comparée à celle des lamines (Hutchison and Worman 2004) : Les filaments intermédiaires ont une structure très conservée avec un domaine central appelé « rod » de type α hélice flanqué par 2 domaines globulaires moins conservés : un domaine N-terminal appelé « head » et un domaine C-terminal appelé « tail ». Le domaine « rod » peut être divisé en 4 segments formés d'heptades interrompus par des « linkers », ces segments sont : 1a, 1b, 2a, 2b, ces derniers sont formés des structures de type « coiled-coil ». Les domaines « linkers » ne sont pas hélicoïdaux. Les différences majeures entre les lamines et les filaments intermédiaires cytoplasmiques sont : a) les lamines ont un domaine N-terminal plus court d'environ 33 acides aminés, b) il y a six heptades supplémentaires entraînant l'extension du coil 1B, c) le domaine C-terminal globulaire est caractérisé par la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et un site CaaX qui est un site pour la méthylation, la farnésylation et le clivage protéolytique.

Chez les mammifères, la famille de type V consiste en 3 gènes qui codent pour sept protéines. Ces protéines sont classées en protéines de type A et de type B. Le nombre et la complexité des gènes et des protéines des lamines nucléaires augmentent durant l'évolution des métazoaires (Cohen et al. 2001).

Par exemple, *Caenorhabditis elegans* a un seul gène de lamines de type B (Riemer et al. 1993), *Drosophila melanogaster* a un gène de type A et un autre gène de type B (Bossie and Sanders 1993; Gruenbaum et al. 1988).

Par contre, les mammifères ont deux gènes de lamines de type B et un gène de lamine de type A qui ont sept isoformes connues (Fisher et al. 1986; Furukawa et al. 1994).

Les lamines de type A/C chez les mammifères peuvent se lier à l'ADN par leur domaine C terminal appelé « Tail » (Stierle et al. 2003).

Malgré la présence d'une enveloppe nucléaire chez les eucaryotes unicellulaires, l'existence des lamines n'a jamais été démontrée.

Georgatos et al. suggèrent la présence d'homologues putatifs des lamines chez *Saccharomyces cerevisiae* (Georgatos et al. 1989), mais cette suggestion n'a pas été confirmée lors du séquençage du génome de cette levure.

D'autres suggestions ont été proposées sur le fait d'existence de lamines putatives dans d'autres eucaryotes unicellulaires et cela en se basant seulement sur la réaction croisée d'anticorps dirigés contre des lamines de mammifères ou d'oiseaux.

Ce cas a été observé chez *Tetrahymena thermophila* (Chen et al. 1994), les dinoflagellés (M.inguey et al. 1994) et chez *Physarum polycephalum* (Lang and Loidl 1993).

Des études effectuées chez la drosophile et le nématode *C. elegans* montrent que les lamines sont des protéines essentielles conférant une stabilité mécanique au noyau (Liu et al. 2000).

Les lamines régulent l'organisation de la chromatine, elles jouent un rôle dans le vieillissement, et les mutations des lamines causent différentes maladies génétiques (Cenni et al. 2005).

L'ensemble de ces observations indique que les lamines nucléaires sont indissociables des fonctions nucléaires et contribuent aux processus de réplication de l'ADN.

I.2.b. Rôle des lamines dans la régulation de la mécanique nucléaire

La lamina nucléaire fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches.

Quels sont ses partenaires dans le noyau? Quels rôles jouent l'ensemble de ces protéines dans la résistance mécanique de l'enveloppe nucléaire, l'organisation du noyau et la régulation du cycle cellulaire?

- **Implication des lamines de type A/C**

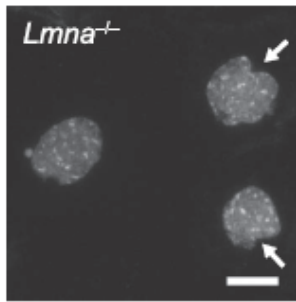
Les mutations des lamines de type A et des protéines de l'enveloppe nucléaire qui y sont associées sont la cause de dix maladies humaines distinctes « les laminopathies » comme : a) Emery-Dreifuss qui cause une dystrophie musculaire. La dystrophie musculaire consiste en une détérioration progressive des muscles du corps (myopathie), engendrant une faiblesse et une invalidité musculaire. b) un syndrome Hutchinson-Gilford progeria, qui se caractérise par un vieillissement prématuré du malade qui amène le plus souvent à une mort avant l'âge de 20 ans (Hutchison and Worman 2004; Broers et al. 2004).

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer les laminopathies (Hutchison and Worman 2004; Broers et al. 2004; Burke and Stewart 2002): 1- Gene Regulation Hypothesis : la perturbation de la régulation des gènes peut causer le développement de différentes maladies, 2- Structural Hypothesis : les mutations des lamines rendent le noyau plus fragile causant la mort cellulaire et éventuellement des maladies des tissus stressés mécaniquement.

Ainsi, les souris qui n'ont ni lamine A ni lamine C manifestent un retard de la croissance et des dystrophies musculaires, elles meurent 4 à 6 semaines après la naissance (Sullivan et al. 1999).

Au contraire, les souris qui n'ont pas la lamine C sont complètement saines.

Des anomalies graves des mécaniques nucléaires dans les cellules qui n'ont pas de lamine de type A (LMNA^{-/-}) [n'ayant ni lamine de type A ni celle de type C] avec réduction de la rigidité nucléaire et augmentation de la variabilité de la forme nucléaire ont été identifiées.



Les cellules qui n'ont pas de lamine de type A (LMNA^{-/-}) [n'ont ni lamine de type A ni celle de type C] ont une forme nucléaire irrégulière (flèches) (Lammerding et al. 2006).

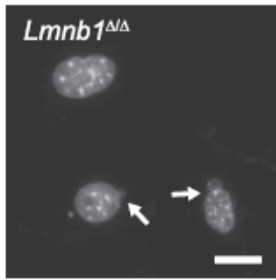
Par contre, les cellules de type LMNA^{+/-} [ayant des quantités réduites de lamine de type A et de type C] causent des anomalies mineures dans la rigidité nucléaire. Les cellules de type LMNA^{-/-} ont une susceptibilité à mourir (Lammerding et al. 2004; Lammerding et al. 2005). Cela définit les rôles des lamines de type A/C dans la détermination de la forme du noyau, de sa rigidité et de sa stabilité, de même dans la viabilité des cellules.

- **Implication des lamines de type B**

Les expériences de RNAi sur les cultures cellulaires des mammifères en utilisant les siRNA suggèrent que les lamines B1 et B2 sont essentielles pour la croissance et la vitalité des cellules (Harborth et al. 2001).

Les souris modifiées génétiquement qui n'expriment pas les lamines de type B1 ont des os et des poumons anormaux durant le développement et meurent tout de suite après la naissance (Vergnes et al. 2004).

Les cellules qui n'ont pas les lamines de type B1 ont des excroissances nucléaires mais présentent des mécaniques nucléaires normales, ce qui suggère que la perte des lamines B1 peut causer des perturbations dans la structure de l'enveloppe nucléaire sans causer des défauts globaux dans l'organisation, la rigidité et la stabilité de la forme nucléaire.



Les cellules qui n'ont pas lamines de type B1 ($Lmnb1^{\Delta/\Delta}$) ont des excroissances nucléaires représentés par des flèches (Lammerding et al. 2006).

- **Synergie entre les différentes formes des lamines**

Il faut noter que la quantité des lamines A et C qui sont deux protéines importantes pour la rigidité nucléaire, est réduite dans les noyaux des cellules qui n'ont pas LMNB1 et cela dans les sites où on a le phénotype « excroissances nucléaires ». Cette quantité est normale ailleurs (Vergnes et al. 2004), ainsi la diminution de cette quantité n'est pas suffisante pour qu'il y ait absence de cette rigidité nucléaire, donc on peut parler d'un rapport stœchiométrique entre l'expression des différents types des lamines de la cellule.

Cela suggère que les lamines de type A et C sont responsables de la rigidité nucléaire, les lamines de type B1 n'ont pas ce rôle et leur absence cause des excroissances nucléaires, suggérant qu'elles jouent un rôle dans l'intégrité du noyau plutôt que dans sa rigidité (Lammerding et al. 2006).

Il est possible que les lamines de type B jouent un rôle de régulation de la rigidité nucléaire mais les isoformes des lamines de type B1 et B2 ont des rôles redondants. La déficience de lamine de type B1 est masquée par l'expression normale des lamines de type B2, on peut parler de la redondance fonctionnelle. Le problème de la redondance fonctionnelle est étudié dans les familles de gènes paralogues issus de duplications ancestrales. D'une façon générale, il apparaît que la différenciation fonctionnelle entre membres d'une famille se fait principalement par modification de l'importance relative des gènes au sein d'une fonction qui reste commune. L'un des gènes devient principal les autres jouent des rôles d'appoint.

En conclusion, les différentes lamines interagissent entre elles *in vivo* pour former des complexes hétérotypiques, ce qui veut dire qu'il y a des espèces moléculaires différentes qui coopèrent pour aboutir à une fonction commune, ce qui suggère que la perte d'une des lamines peut causer des effets secondaires pour les autres lamines dans la cellule.

I.2.c. Rôle des lamines dans l'organisation des pores nucléaires

Les lamines de type A/C jouent un rôle dominant dans la formation des régions dépourvues de pores nucléaires, et cela en coopération avec les protéines de membrane nucléaire interne telles que les protéines de liaison aux lamines (LAPs).

D'autre part, les lamines de type B se localisent rarement au niveau des régions dépourvues de pores nucléaires.

Cela suggère que les lamines de type A et B sont préférentiellement incorporées dans les régions de l'enveloppe nucléaire interne, ayant une corrélation avec la distribution des pores nucléaires (Maeshima et al. 2006).

Il a été observé que les cellules Hela qui expriment de petites quantités des deux isoformes de lamine de type A et C et dont les noyaux présentent une distribution uniforme des pores, ont une activité de prolifération plus grande que celle des cellules normales. Ces observations sont en accord avec le fait que les cellules embryonnaires n'ayant pas les lamines de type A ont une plus grande densité des pores nucléaires et une plus grande activité de prolifération (Maul et al. 1980), cela suggère que les lamines A/C ont un rôle important durant le cycle cellulaire.

De plus, plusieurs études ont montré que l'absence ou la diminution de régulation des lamines de type A/C est corrélée avec une croissance rapide ou une agressivité des maladies humaines comme le cancer testiculaire (Barbie M. Machiels 1997), les lymphomes (Stadelmann et al. 1990) et les carcinomes de peau (Venables et al. 2001).

Ces résultats soutiennent l'hypothèse suivante : La surexpression des lamines de type A/C a une influence négative sur la prolifération cellulaire et leur suppression pourrait causer la genèse des tumeurs à travers l'augmentation de la densité des pores nucléaires.

I.2.d. La lamina comme un élément de tenségrité pour le noyau

La tenségrité est un mot inventé par l'architecte Buckminster Fuller en 1955: Il résulte de la contraction des mots « tensile » et « integrity » et caractérise la faculté d'un système à se stabiliser mécaniquement par le jeu des forces de tension et de compression qui s'y répartissent et s'y équilibrent.

Elle est définie comme une combinaison d'intégrité tensionnelle, les forces au travail dans une structure qui est formée par un réseau fini de compression, ou éléments rigides interconnectés par des éléments tensionnels, ou élastiques qui donnent à la structure son intégrité générale.

A cause de cette propriété élastique des interconnections, quand un élément de la structure est déplacé, ce mouvement est transmis à travers l'ensemble de la structure, et tous les autres éléments se déplacent aussi, ou s'adaptent à une nouvelle configuration, s'adaptant à ces mouvements sans se rompre.

La lamina nucléaire a été décrite comme un élément de tenségrité, laquelle résiste aux forces de déformation et protège les chromatines des forces physiques auxquelles elles sont exposées (Hutchison 2002).

Cette hypothèse est supportée par un certain nombre d'investigations : Par exemple, dans des extraits cellulaires d'ovocytes chez *Xenopus laevis*, l'élimination de la fraction laminaire de l'extrait nucléaire par capture avec des anticorps « anti-lamines » aboutit à l'assemblage des noyaux petits et fragiles (Newport et al. 1990; Spann et al. 1997).

De même, la diminution de l'expression de lamine C par le mécanisme d'ARN interférence chez *Caenorhabditis elegans* aboutit à des formes anormales des noyaux (Liu et al. 2000).

Ainsi les lamines déterminent la forme, la taille et la force de l'enveloppe nucléaire et par la suite possèdent des caractéristiques importantes définissant un élément de tenségrité (Hutchison 2002).

Cependant, les propriétés d'un élément de tenségrité sont probablement déterminées non seulement par les propriétés individuelles des lamines mais aussi par leurs interactions avec les autres composants du cytosquelette (fig.2).

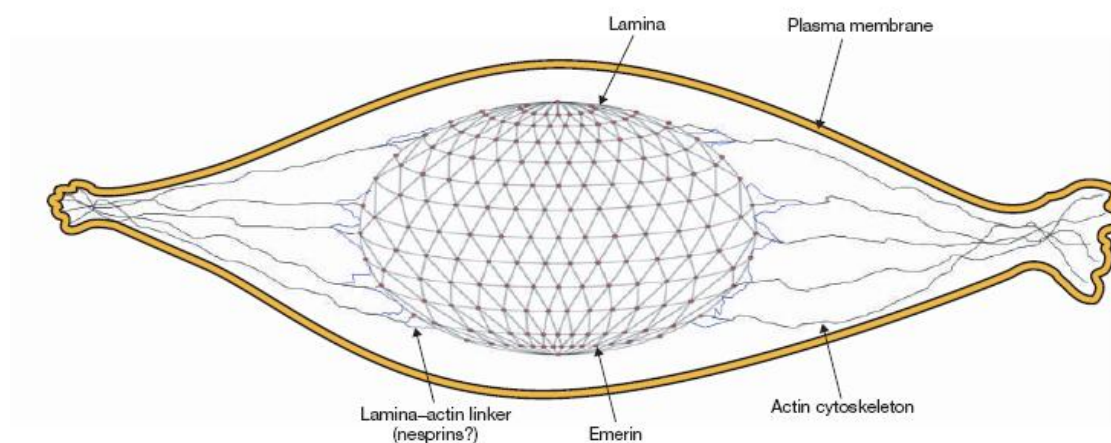


Fig.2 : Modèle proposant la liaison entre la lamina et l'actine du cytosquelette (Hutchison and Worman 2004). Ce modèle soutient l'idée que la lamina nucléaire est une structure de tensegrité dans laquelle les lamines sont représentées par des barres formant une structure en cage qui nous rappelle la structure des dômes géodésiques de Fuller. Cette structure en cage est connectée à l'actine du cytosquelette (longs filaments onduleux) par les « nesprin » (traits bleus) et les « emerlin » (points rouges), ces deux dernières sont attachées à la lamina nucléaire. Ces connections contraignent la forme de la lamina selon la polarité de la cellule.

I.3. Les microfilaments

- **L'actine**

L'actine, composant majeur des microfilaments, est une molécule de 42 kDa très conservée au cours de l'évolution.

Dans des conditions physiologiques, les monomères d'actine (actine G) se polymérisent pour former des filaments hélicoïdaux de 4 à 7 nm de diamètre (actine F).

L'actine joue un rôle fondamental dans la coordination d'un grand nombre de fonctions biologiques. Cette protéine peut, par exemple jouer un rôle dynamique dans la contraction musculaire, la cytokinèse ou l'expansion de pseudopodes. Elle peut aussi avoir un rôle structural dans le contrôle de la morphologie cellulaire. Ces fonctions sont régulées par des protéines associées à l'actine, appelées ABP (Actin Binding Protein), qui constituent une famille complexe tant du point de vue structural que de point de vue fonctionnel.

Un grand nombre d'ABP a été identifié (au moins 160). Actuellement, ces protéines se déclinent en 6 grands groupes dont les fonctions sont les suivantes : Séquestration de monomères d'actine, dépolymérisation, coiffe et nucléation, interconnexion et stabilisation des filaments d'actine.

Les fonctions assurées par les ABP semblent être redondantes en raison de leur diversité limitée par rapport au nombre d'ABP identifiées. En plus de leur capacité à influencer la dynamique d'assemblage des filaments d'actine, un grand nombre d'ABP possède des fonctions spécifiques telles que la liaison de l'actine à la matrice extracellulaire (vinculine), l'ancrage à la membrane (annexine) ou l'utilisation de l'actine comme support mécanique pour induire un mouvement (protéines motrices comme la myosine) (Dos Remedios, 2003).

I.4. Interaction des éléments du cytosquelette

Les microtubules sont capables d'interagir avec les filaments intermédiaires. En effet, la demi-vie ainsi que la motilité des filaments intermédiaires seraient dépendants de la présence des microtubules. Les protéines motrices, kinésines et dynéines, assurent respectivement les transports antérograde et rétrograde des IF, et particulièrement de la vimentine, le long des microtubules (Chang, 2004).

Certaines protéines associées aux filaments intermédiaires (IFAP) comme la desmoplakine, la plectine ont un rôle de liaison des IF entre eux ou avec les microtubules, les filaments d'actine ou la membrane plasmique. Ces protéines présentent un long domaine en α -hélice responsable de la formation de structures homodimériques en « coiled-coil ». Cette région est flanquée de deux domaines non hélicoïdaux : un domaine en N-terminal présentant des motifs de liaison à l'actine et aux microtubules et un domaine C-terminal permettant l'association avec les IF. La liste des IFAP ne cesse de s'accroître révélant ainsi le degré de complexité structurale et fonctionnelle des réseaux d'IF formés dans la cellule.

Ces résultats montrent que la motilité et l'organisation des IF peut être régulée par de nombreux modulateurs agissant conjointement : IFAP, microtubules ou microfilaments.

Il est évident que la régulation de l'interaction moléculaire entre les trois systèmes cytosquelettiques conduira une grande partie de la future recherche en biologie cellulaire.

II. Conclusion

Un des rôles potentiels du cytosquelette pourrait être de fournir une matrice pour régler l'assemblage, l'organisation et la fonction des complexes de protéines et des organelles à l'intérieur de la cellule. Un dialogue entre les trois différents composants du cytosquelette est nécessaire pour le maintien des fonctions accomplies par ce dernier qui sont: le maintien de la forme cellulaire, la résistance aux chocs mécaniques, la locomotion, la séparation des chromosomes durant la mitose et la méiose et le transport intracellulaire des organelles.

Ainsi, cette conclusion n'est pas seulement vraie juste pour les composants du cytosquelette. Au contraire, elle est presque toujours vraie en biologie cellulaire. Ainsi, une structure se trouvant seule ne faisant pas d'échange et de dialogue avec d'autres structures ne servira à rien, mais c'est la coopération générale des éléments d'une structure qui interprète et transmet l'information. Dans le cas du cytosquelette, c'est cette coopération qui va transmettre le message pour maintenir la forme et la division de la cellule.

Chapitre II

Présentation de la Paramécie

Chapitre II : Présentation de la Paramécie

I. Présentation générale

La paramécie est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé au microscope. Depuis lors, sa facilité de culture, sa grande taille (120 μm de longueur en moyenne et 48 μm de largeur environ), la facilité d'observation de ses fonctions cellulaires variées en ont fait un modèle d'étude privilégié pour les biologistes cellulaires.

L'espèce étudiée au laboratoire est *Paramecium tetraurelia*. Cette cellule de grande taille (à peu près 130 μm) a une polarité dorso-ventrale, la face ventrale étant reconnaissable par la présence d'une grande invagination correspondant à l'appareil oral. Sur la face dorsale se trouvent deux vacuoles pulsatiles (fig. 3).

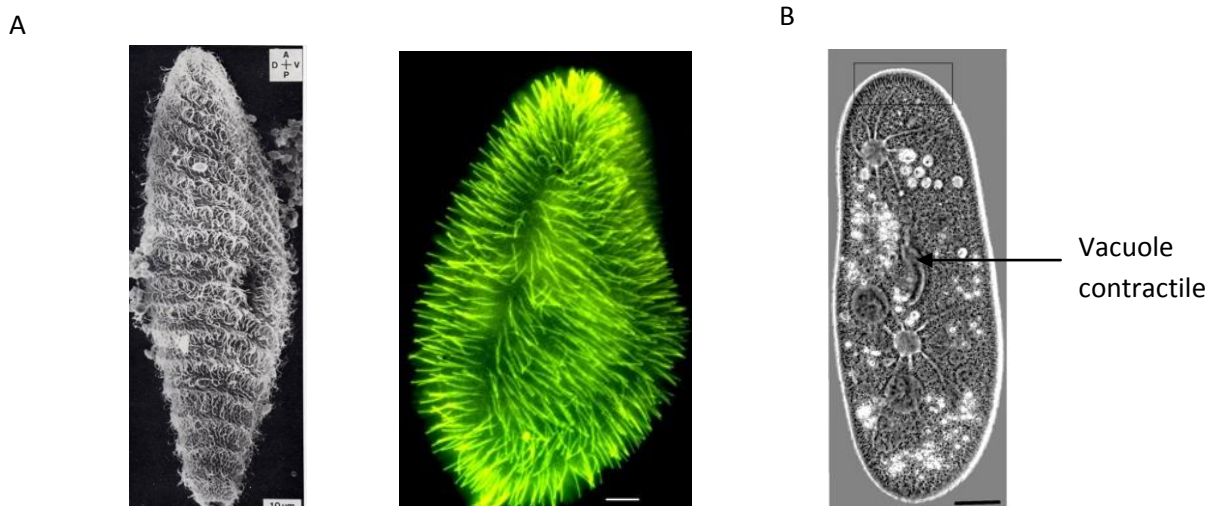
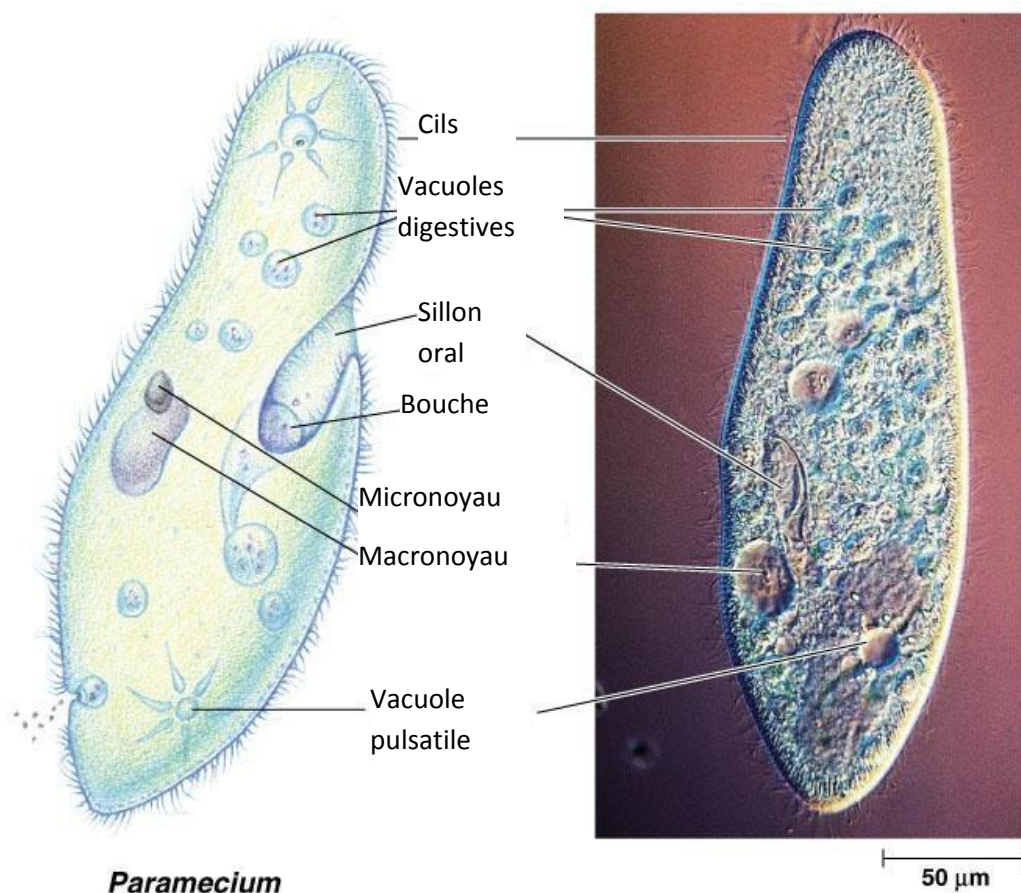


Fig. 3 : Présentation de la paramécie

A- Vue d'une paramécie en microscopie électronique à balayage, la ciliature d'une paramécie vue en immunofluorescence (anticorps anti-tubuline).

B- Paramécie vue en contraste de phase (Gogendeau, 2005).

La paramécie, polarisée et asymétrique, présente de nombreux organites différenciés ayant des fonctions très spécialisées : le goulet de phagocytose permet l'ingestion des bactéries, le cytoprocte (ou anus cellulaire) est nécessaire à l'expulsion des déchets, et les vacuoles pulsatiles servent à réguler l'osmolarité. Une des plus grandes caractéristiques de la paramécie est la présence de milliers de cils vibratoires sur sa surface, permettant la locomotion et la nutrition. La paramécie possède également une voie de sécrétion régulée, la voie d'exocytose, des trichocystes, moyen de défense contre ses prédateurs, ainsi qu'un cortex complexe.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

II. Dimorphisme nucléaire et cycle de vie

Comme la plupart des ciliés, la paramécie est caractérisée par un dimorphisme nucléaire : elle possède un macronoyau hautement polyploïde (800 n) transcriptionnellement actif pendant la vie végétative et deux micronoyaux germinaux nécessaires à la transmission de l'information génétique.

En phase végétative et à une température de 27°C, les cellules se divisent environ toutes les 5 heures. Mais en condition de carence alimentaire, les cellules entament une reproduction sexuée qui peut être de deux types : la conjugaison (fécondation réciproque entre deux partenaires) et l'autogamie (autofécondation) (Sonneborn, 1974). A chaque événement sexuel, l'ancien macronoyau est dégradé et un nouveau est alors formé à partir d'un micronoyau par amplification de chromosomes et élimination de séquences. Suite à l'autogamie, on a :

- 1- conservation du patrimoine génétique, perte de l'histoire évolutive des macronoyaux.
- 2- Perte du transgène injecté dans le macronoyau de la paramécie.

III. Le génome de la paramécie

Des généticiens du CNRS et du Génoscope – Centre National de Séquençage, ont réalisé le décryptage du génome somatique de la paramécie et ont découvert que cet organisme possède 40 000 gènes (Aury, 2006) nettement plus que l'homme qui en a tout au plus 25 000 ! Le séquençage des génomes de plantes et d'animaux avait déjà montré une absence de corrélation entre la complexité des organismes pluricellulaires et le nombre de gènes qu'ils possèdent dans leur génome. Ce paradoxe s'étend donc désormais à l'ensemble des eucaryotes, y compris unicellulaires. Ils ont ensuite démontré que ce patrimoine est le résultat d'au moins trois duplications successives de tout le génome.

Suite à ces duplications du génome chez la paramécie, on obtient des gènes paralogues formant des familles multigéniques dont on parle dans le chapitre IV.

Chapitre III

Le cytosquelette cortical chez les

Protistes Ciliés

Chapitre III : Le cytosquelette cortical chez les Protistes Ciliés

Les ciliés possèdent une organisation complexe. Ils présentent un cytosquelette hypertrophié et ont développé une surface constituée de centaines ou des milliers des unités corticales alignées en rangées longitudinales. Chaque unité porte un ou deux cils, issus chacun d'un corps basal.

La plupart des protistes se distinguent des cellules d'organismes métazoaires par la présence d'une armature cytosquelettique complexe au niveau du cortex (fig.4). Certains constituants du cytosquelette cortical des protistes sont communs au cytosquelette des métazoaires. C'est le cas des systèmes microtubulaires qui sont particulièrement développés dans la région corticale des ciliés (e.g. *Paramecium* et *Tetrahymena*) et de certains parasites (e.g. *Trypanosoma* et *Toxoplasma*).

C'est de toute évidence chez les ciliés que le cytosquelette cortical et sa dynamique ont été principalement étudiés. Ainsi, chez la paramécie, la microscopie électronique a permis l'identification des plusieurs organisations successives dans le cortex : On trouve la membrane plasmique qui couvre la cellule et les axonèmes, des alvéoles corticales qui forment une couche continue interrompue par les points d'implantation des corps basaux, des trichocystes et par des invaginations de la membrane qui sont définies comme les sacs parasomaux. Ce cortex se sub-divise en centaines d'unités corticales délimitées par un réseau filamenteux à mailles hexagonales qui lui est propre, appelé réseau externe ou « outer lattice » (Allen, 1971) (fig.5 et 6). Le territoire défini par chaque maille du réseau externe est une unité corticale. Chaque unité corticale est centrée autour d'un appareil ciliaire, on parle alors d'écaille épiplasmique. Cette écaille est en forme de coupelle associée à un sac alvéolaire.

L'ensemble écailles épiplasmiques/outer lattice forme un continuum qui assure la fonction de squelette membranaire chez la paramécie. Les écailles épiplasmiques et leur détournage par les mailles de l'outer lattice confèrent une architecture en nid d'abeille au squelette membranaire de la paramécie. Sous les alvéoles se trouve l'épiplasme qui est une couche presque continue interrompue au niveau des points d'émergence des corps basaux, des trichocystes et des sacs parasomaux.

De même, on trouve une couche cytosquelettique profonde située à la base des corps basaux, l'Infraciliary Lattice, un réseau irrégulier des filaments n'adoptant pas strictement la forme des unités corticales. Associés à ces couches qui forment un continuum, il y a les appendices

associés à chaque corps basal : la fibre cinétodesmale, et les fibres microtubulaires transverses et postciliaires, toutes sont ancrées profondément au niveau du corps basal et remontent vers l'épiplasma pour entretenir des relations mécaniques. Elles entretiennent des relations mécaniques importantes avec l'épiplasma et servent à l'ancrage des cils. L'ensemble de ces éléments qui peuvent être vus comme couches successives forment le cortex.

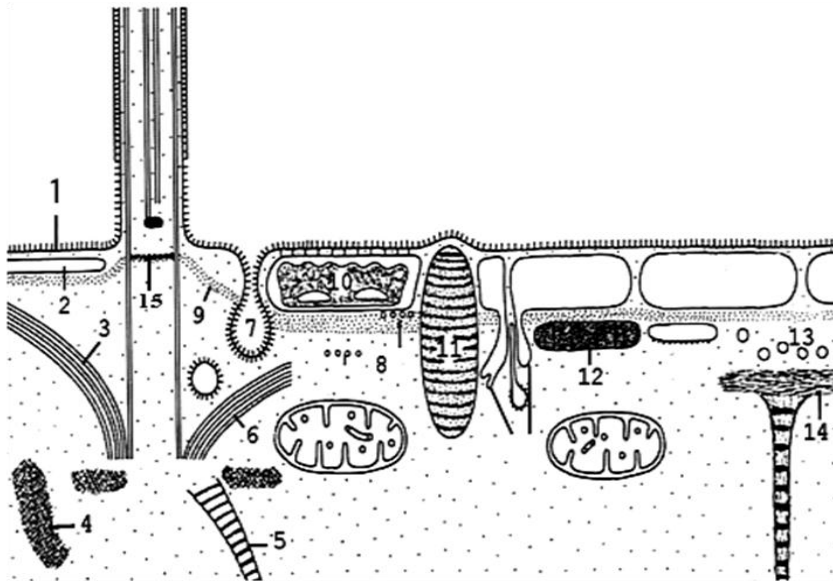


Fig.4 : Représentation schématique des principales structures corticales chez les ciliés.

1 : membrane plasmique, 2 : alvéoles, 3 : microtubules postciliaires, 4 : myonèmes, 5 : fibres cinétodermiques, 6 : microtubules transverses, 7 : sacs paraxiaux, 8 : microtubules longitudinaux, 9 : épiplasma, 10 : épiplasma alvéolaire, 11 : extrusome, 12 : réserves polysaccharidiques, 13 : vésicules, 14 : faisceau de filaments, 15 : plaque terminale.

(Hausmann, 1996)

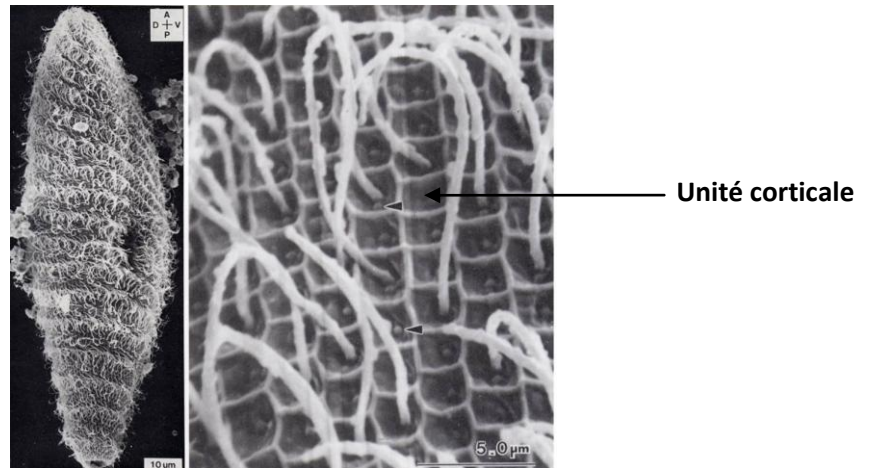


Fig.5 : Vue d'une paramécie en microscopie électronique à balayage. Son architecture de surface est constituée de plusieurs milliers d'unités corticales centrées autour des corps basaux. D'après (Adoutte, 1996).

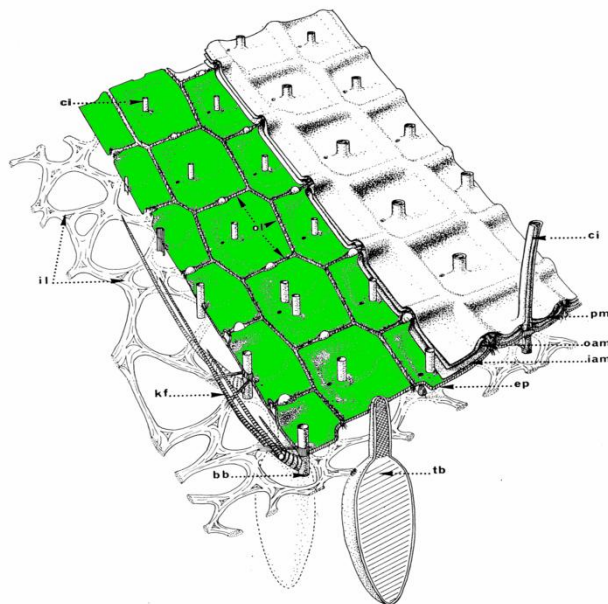


Fig.6 : Représentation tridimensionnelle du cortex de Paramecium. Les principales structures cytosquelettiques sont l'épiplasme (ep) associé à la membrane alvéolaire interne (iam) et le réseau infraciliaire (il) localisé dans le plan des cinétosomes (bb). Cil (ci), réseau externe (ol), trichocystes (tb), fibre cinétodesmale (Kf), membranes plasmique (pm) et alvéolaire interne (oam). (Keryer, 1990).

I. Les composants du cytosquelette cortical

I.1. Les systèmes microtubulaires chez *Tetrahymena* et *Paramecium*

Comme dans le cas des cellules de métazoaires, le cytoplasme des protistes ciliés renferme un réseau dynamique de microtubules assurant le déplacement des organites pendant l'interphase. Ce réseau s'organise aussi en fuseaux mitotiques au cours de la division et forme le cytofuseau cortical et le fuseau intranucléaire (Cohen, 1988).

Toutefois, la majeure partie des structures microtubulaires est localisée au niveau cortical, dans les cils organisés en rangées parallèles appelées cinéties.

Les cils sont constitués de 9 doublets de microtubules périphériques et d'un doublet central (fig.7). A la base des cils se trouvent les cinétosomes ou corps basaux dont le rôle est d'assurer la nucléation des microtubules de l'axonème. Tout comme les centrioles de cellules de métazoaires, les corps basaux résultent de la juxtaposition de 9 triplets périphériques de microtubules (un complet, le tubule A et deux incomplets les tubules B et C formés de 10 protofilaments seulement). Les tubules A, B et C ne sont pas équivalents et confèrent aux corps basaux, indépendamment de leur polarité proximo-distale, une asymétrie périphérique qui est nécessaire à plusieurs de leurs fonctions (Beisson, 1999), comme leur implication dans des processus fondamentaux chez les eucaryotes tels que la division cellulaire, la morphogenèse ou l'assemblage des axonèmes des cils et des flagelles.

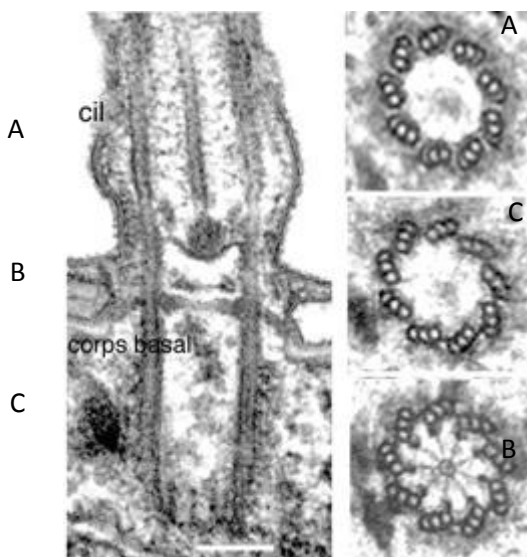


Fig. 7: Ultrastructure d'un corps basal :

*A gauche, la coupe longitudinale à travers le corps basal.
A droite, coupes transversales à différents niveaux du corps basal.*

D'après www.cgm.cnrs-gif.fr/paramecie/biogenese_fr.html

Le cinétosome est associé à plusieurs racines ciliaires qui à l'exception des fibres cinétodesmales, sont toutes de nature microtubulaire. Grâce à une étroite association avec l'épiplasma à leur extrémité distale, ces fibres contribuent à l'implantation et à l'orientation du cinétosome et donc du cil à la périphérie des cellules. La fibre cinétodesmale est située à droite du corps basal et sa direction indique le pôle antérieur de la cellule (fig.8) (Iftode and Fleury-Aubusson 2003).

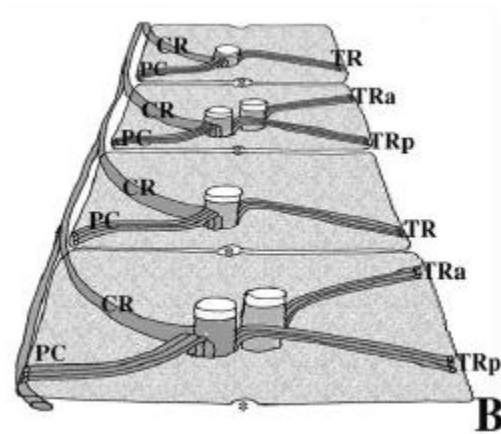


Fig.8 : Les corps basaux sont entourés de 3 types d'appendices distincts : les deux appendices microtubulaires, les rubans transverses (TR) et les rubans post-ciliaires (PC) et la fibre striée (CR). (Iftode and Fleury-Aubusson 2003).

Dans le cas des unités corticales portant un seul corps basal et appelées « les monokinétides », le corps basal porte une fibre striée. Du côté de la fibre, on trouve également le ruban de microtubule postciliaire qui est orienté vers le pôle postérieur de la cellule. Du côté gauche, se trouve le ruban de microtubules dont les microtubules sont dirigés vers la gauche de la cellule vers le pôle postérieur.

Dans les unités corticales ayant deux corps basaux et appelées « les dikinétides », seul le corps basal postérieur porte une racine striée et un ruban postciliaire. En revanche, les deux corps basaux portent chacun un ruban de microtubules transverses, celui du corps basal antérieur étant dirigé vers le pôle antérieur de la cellule (fig.8).

Tous ces appendices relient donc solidement le corps basal à son environnement cytosquelettique.

I.2. Le système de microfilaments :

Contrairement aux protistes présentant un type amoeboïde d'organisation cellulaire ou à la plupart des cellules des Métazoaires, les ciliés ne semblent pas utiliser intensément l'actine pour la construction de leur cytosquelette. L'actine est néanmoins présente chez les ciliés comme l'ont montré Cohen et al. (1984) et Méténier (1984). Les marquages révèlent les filaments d'actine aux alentours des vacuoles digestives en formation. Aucune décoration n'est détectée au niveau de l'anneau contractile permettant la cytodierèse. A noter que chez les protistes, de nombreux systèmes filamenteux dont les éléments constitutifs sont des filaments de 2 à 6 nm ont été identifiés. Ils ne contiennent pas d'actine malgré leur appartenance à des structures généralement contractiles. Ainsi l'idée des microfilaments non actine a été proposée pour les distinguer de l'actine filamenteuse (Viguès et al. 1985). Un des exemples de ces microfilaments non actine est une protéine de 85 kDa jouant un rôle dans la cytokinèse chez *Tetrahymena*.

- **L'exemple du processus de cytokinèse chez *Tetrahymena***

Suite à la division du micronoyau, une protéine de 85 kDa, caractéristique de *Tetrahymena* et nommée P85, apparaît dans le domaine présomptif du sillon de division. Cet événement, précédant la division du macronoyau et l'apparition de l'actine en forme d'anneau en région équatoriale, serait l'un des plus précoces dans le processus de cytokinèse chez *Tetrahymena*.

Le groupe du Dr.O. Numata (2001) a montré que la protéine p85 interagit directement de façon Ca^{2+} dépendante avec la calmoduline (CaM) et de façon $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dépendante avec l'actine G. Des expériences de traitement par un inhibiteur du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ont montré que ce complexe est indispensable à l'ancrage de la protéine p85 dans le territoire présomptif du sillon de division pendant la cytokinèse.

L'ensemble p85/ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ aurait ainsi un rôle à la fois dans la mise en place du sillon de division et la formation de l'anneau contractile dans la cytokinèse chez *Tetrahymena*.

En immunofluorescence, Hirono, 1987 et al. ont mis en évidence la présence d'actine dans l'anneau contractile chez *Tetrahymena*.

I.3. Le réseau d'épiplasme chez *Euglènes*, *Pseudomicrothorax*, *Euplotes*, *Tetrahymena* et *Paramecium*

On vient de voir que les microfilaments constituent finalement des éléments cytosquelettiques assez discrets (limités dans l'espace et dans le temps) et ne forment pas des structures capables de sous-tendre l'ensemble de la périphérie cellulaire et de jouer un rôle intégrateur. Chez ces unicellulaires, un bon candidat est représenté par une couche fibro-granulaire, l'épiplasme, qui constitue une couche plus ou moins continue, présente dans certains organismes flagellés comme les dinoflagellés ou les euglènes et chez la plupart des protistes ciliés.

I.3.a. L'épiplasme chez les euglènes : une structure majoritairement composée d'articulines

Les articulines sont des protéines identifiées dans le cytosquelette sous-membranaire des euglènes. L'organisation corticale des euglènes est caractérisée par une succession de crêtes et des sillons (fig.9). Dans ces organismes dépourvus d'alvéoles, la membrane plasmique est directement en association avec un épiplasme qui est renforcé par un réseau de microtubules longitudinaux. Chez *E.gracilis*, les articulines ont un poids moléculaire de 80 et 86 kDa. Elles représentent 60% du squelette membranaire de cet organisme. La caractérisation de leur séquence nucléique a montré l'existence d'un long domaine central formé de 33 répétitions de 12 acides aminés comportant le motif VPVP (Marrs, 1992).



Fig.9 : Représentation schématique d'une coupe longitudinale du cortex des *Euglènes*. Mb : membrane plasmique, ep : épiplasme, L1 et L2 : liens épiplasmiques. D'après (Bricheux, 1986).

I.3.b. L'épithélium chez *Pseudomicrothorax* : une structure majoritairement composée d'articulines

Le squelette membranaire (épithélium) de *Pseudomicrothorax* est une couche protéique épaisse et continue (Peck, 1991 ; Peck, 1977) (fig.11). Il est constitué de deux groupes de protéines majeures, 78-80 kDa et 11-18 kDa, ainsi que d'une série de composants mineurs dont les poids moléculaires sont compris entre 18 et 62 kDa. Le groupe de protéines de 78-80kDa se résout en au moins 6 spots par électrophorèse bidimensionnelle. Les spots 1 et 4 sont majoritaires quantitativement. Une analyse des profils de digestion peptidique montre que les spots 2 et 3 sont des variants isoélectriques du polypeptide 1 (Huttenlauch et Peck, 1991). Par immunomarquage ultrastructural, il a été démontré qu'au moins une de ces protéines est associée à l'ensemble de l'épithélium, alors que les composants mineurs, qui sont glycosylés, sont localisés à la surface externe de l'épithélium ou pourraient être des protéines de membrane fermement attachées à l'épithélium (Huttenlauch et Peck, 1991, Curtenaz et Peck, 1992).

La caractérisation moléculaire des constituants épithéliques de *Pseudomicrothorax dubius* a débuté par la caractérisation de l'ADNc codant pour la protéine épithélique P60 (60 kDa) (Huttenlauch, 1995). Il est à noter que la protéine p60 de *Pseudomicrothorax* n'est pas décrite comme étant un constituant majeur de l'épithélium (Peck, 1991).

L'analyse de la séquence en acides aminés révèle la présence de motifs répétés de type VPVPV caractéristique des articulines. Cette séquence est répétée 29 fois tout au long de la séquence p60 (Huttenlauch, 1995, Huttenlauch, 1998). Il y a donc moins de répétitions que sur les articulines d'Euglène. Les séquences complètes des polypeptides 1 et 4 ont été obtenues (Huttenlauch, 1998), montrant encore la répétition du motif VPVPV caractéristique des articulines.

Les articulines forment donc une famille des protéines présentes dans des organismes variés allant des ciliés aux flagellés.

- **Caractéristiques des articulines**

Les comparaisons de séquences entre les deux articulines majeures de *Pseudomicrothorax dubius*, celle mineure de la même espèce et les deux articulines majeures

d'*Euglena gracilis* montrent des caractéristiques générales identiques pour ce nouveau type de protéines du cytosquelette (Huttenlauch, 1998). Toutes les articulines ont une structure tripartite (fig.10). Chez *Pseudomicrothorax*, le nombre de répétitions est de 29 pour la protéine mineure p60, et de 30 et 31 pour les articulines majeures 1 et 4 respectivement. Lorsqu'elles sont présentes, les régions séparant les motifs répétés VPVPV sont au maximum de six à huit résidus. De plus, les résidus chargés, lorsqu'ils sont présents, sont ordonnés d'une manière caractéristique : La position des prolines correspond à des charges négatives alors que la position des valines peut être substituée par des charges positives. Ainsi le principe général de séquence du domaine central des articulines pourrait être une simple alternance de résidus valine et proline en même temps qu'une alternance de résidus chargés.

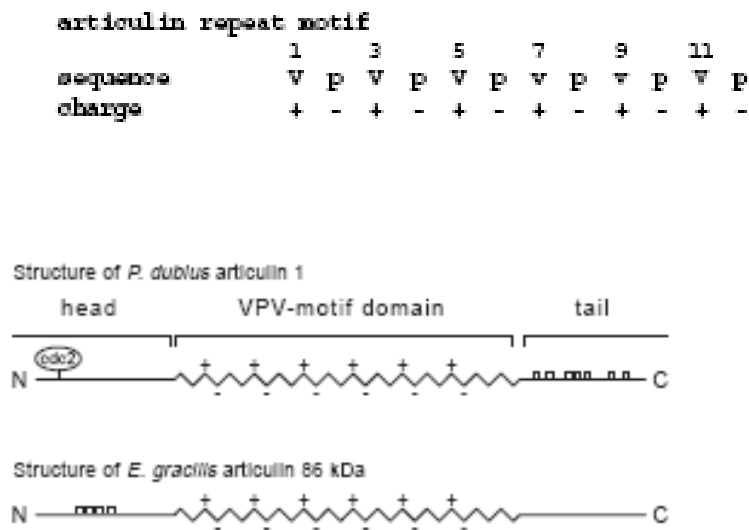


Fig.10 : Structure des articulines (D'après Huttenlauch et al. 1998).

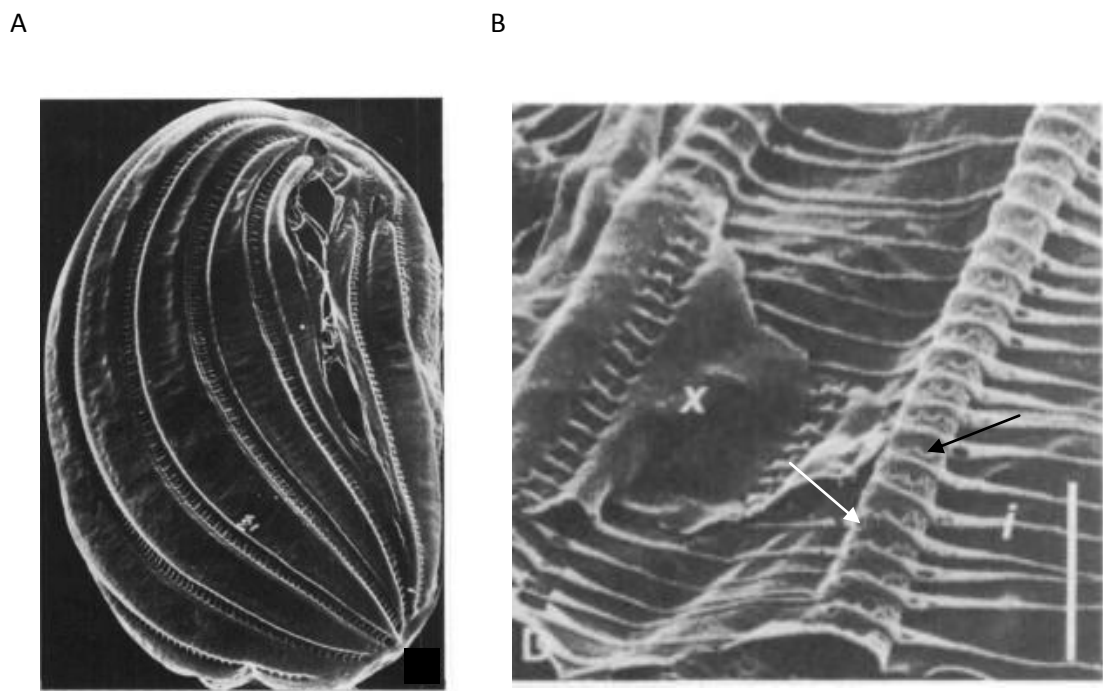


Fig.11 : Observations en microscopie électronique à balayage du squelette membranaire de *Pseudomicrothorax* (A) et vu de l'intérieur de la cellule (B).

Noter la présence des lignes d'implantation des cinétosomes (flèches blanches) et des trichocystes (flèches noires). Les surfaces internes (I) et externes (X) sont également mises en évidence. (Peck, 1977; Peck, 1991).

I.3.c. L'épithélium chez les euplotes : une structure composée de protéines homologues aux articulines

Chez les Euplotes, l'organisation cytosquelettique de type épithélium est intra-alvéolaire sous la forme de plaques et non pas sous alvéolaire comme dans la plupart des ciliés. L'ensemble d'unités plaque/alvéole est intégré dans un réseau contigu qui se compose d'un matériel fibreux. Deux protéines de 116 et 110 kDa composant les plaques alvéolaires ont été mises en évidence chez *E. eurytomus* (Williams, 1989).

L'électrophorèse bidimensionnelle révèle la présence de trois polypeptides distincts analogues à trois protéines de *E. aediculatus* révélées à l'aide d'anticorps monoclonaux (Williams, 1991, Kloetzel, 1991) et nommées platéines α (125 kDa), β (99 kDa), et γ (95-97 kDa).

La séquence nucléique des platéines a été caractérisée à partir de microséquences de protéines purifiées révélant la présence d'un gène codant pour la β/γ platéine et de deux gènes, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ codant pour la forme α (Kloetzel, 2003a ; Kloetzel, 2003). Ces protéines présentent à leur extrémité N-terminale une séquence hydrophobe d'adressage et de transport membranaire (peptide signal) en accord avec la localisation intra-alvéolaire des platéines. En outre, les platéines sont composées d'un domaine placé en position centrale, présentant des motifs répétés de 12 acides aminés riches en valine et proline (27 pour la β/γ , 28 pour la $\alpha 1$ et pour la $\alpha 2$ platéine). Elles présentent également un autre domaine, situé en N-terminal des α -platéines et en C-terminal de la β/γ platéine riche en proline avec des motifs plus courts et moins nombreux.

L'analyse des séquences protéiques a révélé l'appartenance des platéines à la famille des articulines en raison d'une forte identité entre le domaine central des platéines et les répétitions VPVP qui sont la signature des articulines.

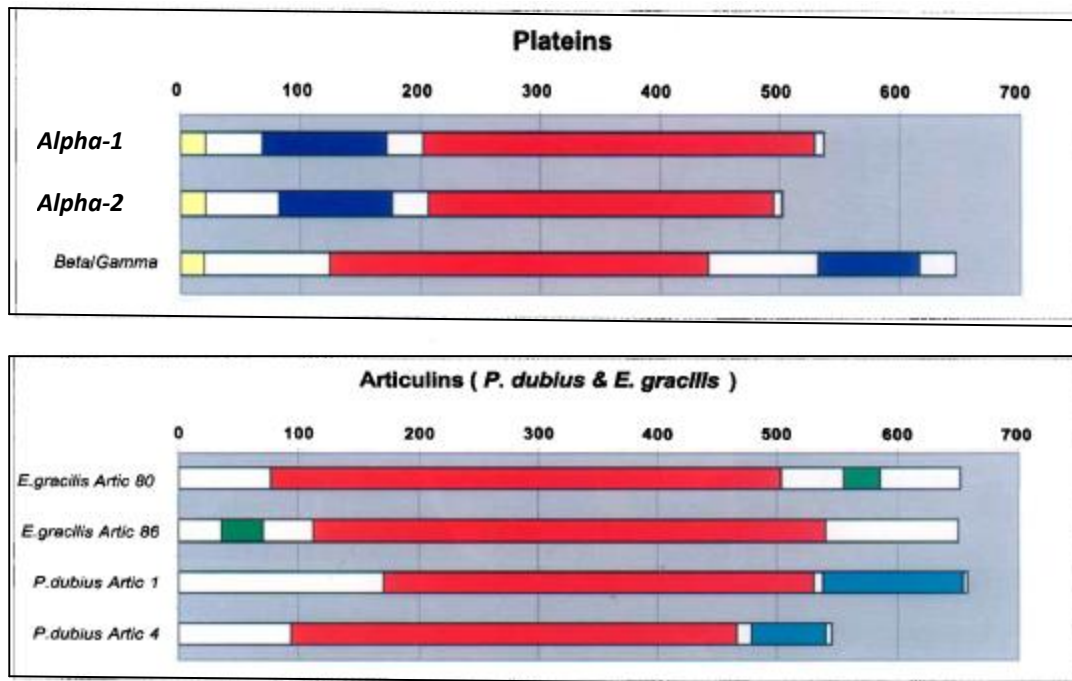


Fig.12 : Modèle d'architecture moléculaire des platéines (haut) et des articulines d'*Euglena* et de *Pseudomicrothorax* (bas) (Kloetzel, 2003a). Le domaine central, présentant les motifs VPVP (12-mères) sont indiqués en rouge. En bleu et vert sont représentés les domaines secondaires dont les compositions diffèrent entre les espèces. Le peptide signal en N-terminal, unique aux platéines est représenté en jaune.

I.3.d. L'épiplasme chez *Tetrahymena*

Chez *Tetrahymena*, l'épiplasme forme un ensemble quasi-continu semblable à celui décrit chez *Pseudomicrothorax* (fig.13). L'analyse des protéines épiplasmiques en SDS-PAGE montre la présence de 3 bandes majeures A, B et C (Vaudaux, 1976 ; Vaudaux, 1979). Une analyse comparative des différentes espèces de *Tetrahymena* (Williams, 1984), a montré une conservation de la bande A (235 kDa) et une variabilité du PM des bandes B (135 kDa pour *T. Pyriformis* et 130 kDa pour *T. Thermophila*) et la bande C (125 kDa pour *T. Pyriformis* et 110 kDa pour *T. Thermophila*). A l'aide d'anticorps monoclonaux, des parentés antigéniques ont été caractérisés entre les protéines A, B et C (Williams, 1987). Parmi ces protéines, la bande C semble être prédominante (Williams, 1995). Chez *T. Pyriformis*, la protéine constituant la bande C présente des propriétés antigéniques avec la GFAP qui est une protéine de filaments intermédiaires caractéristiques des astrocytes et des cellules d'origine gliale (Bouchard, 1998).

La caractérisation moléculaire de cette protéine, nommée épiplasmine C (EpiC), a montré l'existence de 25 domaines de 40 à 50 résidus présentant une forte similarité structurale avec 6 heptades présents dans le coil-1B des lamines. Ces 6 heptades formant 42 aa sont caractéristiques des filaments intermédiaires nucléaires (Bouchard, 2001) (fig.14).

A



B

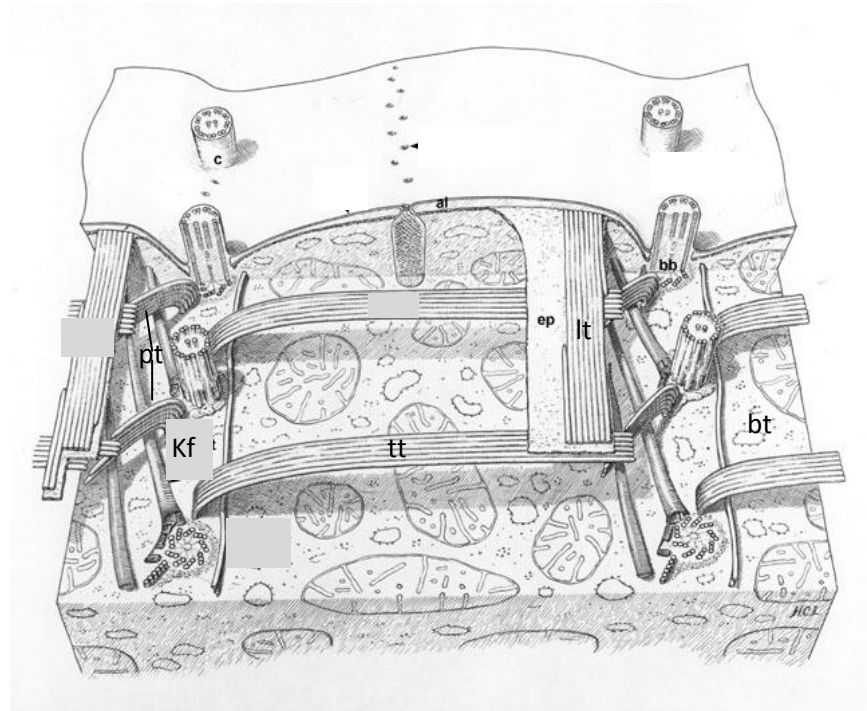


Fig.13 : Organisation de la surface et du cortex de Tetrahymena

A : Observation en microscopie électronique à balayage.

B : Représentation tridimensionnelle du cortex de Tetrahymena. Ep : Epiplasma, C : cil ; fibres microtubulaires basales (bt), longitudinales (lt), post-ciliaires (pt) et transversales (tt), fibres cinétodesmales (kf), a : alvéole sous-membranaire.

D'après <http://www.aecom.yu.edu/satir/projects/tetrahymena/> et Allen, 1967.



Fig.14: Représentation schématique des domaines répétés de l'EpiC.

L'épiplasmine C est représentée comme la succession de 25 domaines de 40 acides aminés. Les carrés représentent les domaines de type I et les cercles les domaines de type II révélés par l'analyse HCA (Hydrophobic Cluster Analysis). D'après Bouchard, 2001

I.3.e. L'épiplasme chez *Paramecium*

Les premières analyses biochimiques sur l'épiplasme réalisées en 1993 et 1997 ont montré que l'épiplasme était composé d'un ensemble de 30 à 50 protéines situées dans une gamme de poids moléculaire allant de 30 à 50 kDa, appelées les épiplasmines (Nahon, 1993; Coffe, 1996). L'étude de la composition biochimique de l'épiplasme réalisée par (Coffe et al. 1996), a permis de déterminer les conditions de solubilisation des épiplasmines, ainsi que celles nécessaires à leur assemblage *in vitro* en agrégats filamenteux. En fonction de leurs propriétés d'assemblage et d'hydrophobicité, les épiplasmines de la paramécie se subdivisent en 3 groupes correspondant à des groupes de mobilité électrophorétique distincts : les LMW (Low Molecular Weight), les MMW (Middle Molecular Weight) et les HMW (High Molecular Weight). Les poids moléculaires moyens de ces peptides figurent dans une gamme de taille comprise entre 33 et 45 kDa.

Des microséquences protéiques de fragments d'épiplasmines purifiées révèlent l'abondance des résidus Q, P et V. Par approches PCR utilisant des sondes dégénérées, trois classes de séquences de plus longues tailles ont été obtenues (Coffe et al. 1996), chacune présentant des répétitions en heptades avec le motif réccurent QPVQ-h- (où h est un résidu hydrophobe). Ces répétitions QPVQ-h- ont la propriété de former des structures coiled-coil qui contribueraient à l'autoassemblage des épiplasmines de cet organisme.

Ces microséquences ont été exploitées dans le but de parvenir à cloner et à séquencer des gènes complets, via l'utilisation de nouvelles PCR combinées à des analyses de Southern-blot optimisées pour le modèle *Paramecium*. La mise à disposition par le groupe de J. Cohen (Centre de génétique moléculaire, CNRS, Gif/Yvette) d'une banque indexée de *Paramecium tetraurelia*, a permis à Marie Diogon dans le cadre de sa thèse en 2002, de caractériser deux protéines épiplasmiques de la paramécie. Ces deux protéines ont été caractérisées par la présence en N- et C- terminaux de régions riches en prolines. Entre les deux domaines, on trouve une région riche en résidus tyrosine, délimitée par deux sites potentiels de phosphorylation dont la représentation est présente en figure 15.

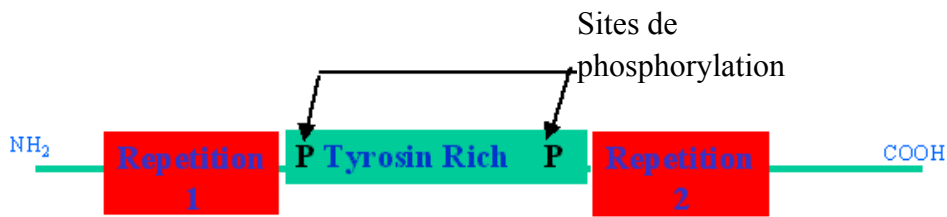


Fig.15 : Représentation graphique de la structure des épiplasmines.

Grâce à la disponibilité du génome, et en utilisant ces deux gènes d'épiplasmines comme sonde, Pomel et al. (2006) ont contribué à l'annotation du génome macronucléaire de *Paramecium tetraurelia* et ont identifié l'existence de 39 séquences paralogues supplémentaires formant une famille multigénique de 41 épiplasmines.

L'épiplasme chez la paramécie est formé des plaques accolées les unes aux autres qui sont délimitées par un réseau externe appelé « outer lattice » (fig.16). Ce réseau a pu être étudié grâce à l'anticorps CC212, produit contre une préparation de corps basaux et de matériels associés provenant de cellules ciliées de l'oviducte de caille (Cohen, 1987). Cet anticorps reconnaît une protéine de 200 kDa dans l'oviducte de caille qui s'est avérée être une myosine cytoplasmique (Klotz, 1986) tandis qu'il semble reconnaître chez la paramécie deux protéines, une de 50 et une de 130 kDa non apparentées aux myosines.

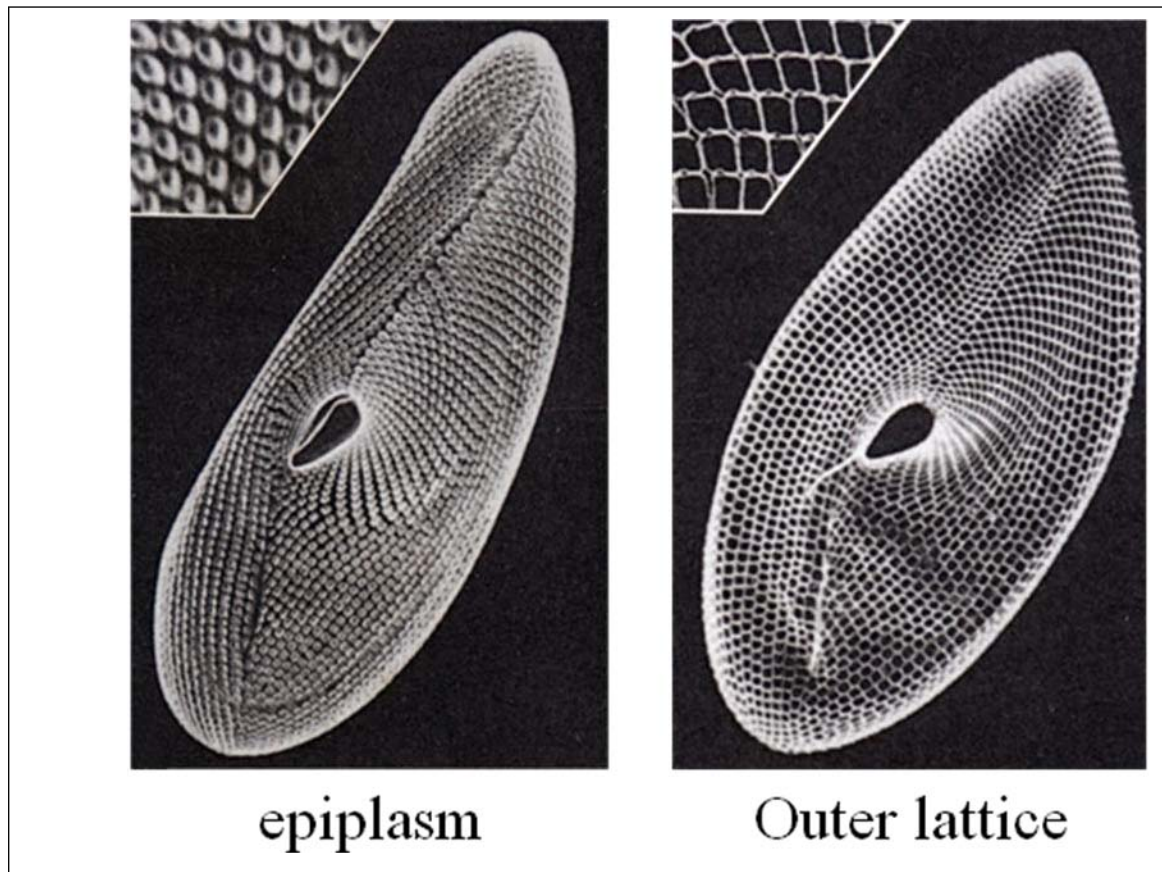


Fig. 16: A- Immunofluorescence de l'épiplasm chez la paramécie à l'aide de l'anticorps CTS-32, un anticorps monoclonal qui reconnaît toutes les épiplasmines de la paramécie. (Jeanmairewolf, 1993)

B- Immunofluorescence de l'outer lattice chez la paramécie en utilisant un anticorps anti-outer lattice.

- **Relations entre épiplasmies**

La description biochimique des protéines épiplasmiques chez les protistes montrent que ces protéines se caractérisent par une importante variabilité intra et interspécifique.

Les relations immunologiques entre protéines épiplasmiques de divers protistes ont été examinées. Il a été montré l'existence d'immunoanalogues des articulines et des épiplasmines chez les quatre protistes ciliés *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Euplotes*, et *Pseudomicrothorax* (Huttenlauch, 1998b, Huttenlauch and stick, 2003). Cependant, une absence de signal avec l'anticorps CTS32 sur les protéines corticales de *Tetrahymena* a été montrée par Nahon et al. (1993). Les anticorps anti-épiplasmines et anti-articulines reconnaissent des bandes protéiques distinctes en Western blot dans l'ensemble des organismes étudiés par Huttenlauch et al. (1998). Un anticorps polyclonal, dirigé contre les articulines de *P.dubius* et nommé « sérum 018 », a été sous-fractionné par immuno-affinité vis-à-vis d'extraits épiplasmiques de *Paramecium* ou de polypeptides présentant le domaine VPVP des articulines. Dans un cas particulier, un constituant épiplasmique de *P.dubius*, l'articuline 1, a été identifié réagissant à la fois avec les anticorps anti-épiplasmines (CTS32) et l'anti-articulines (4B5F3). Cependant, dans cette protéine, l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 4B5F3 est situé dans le domaine central de l'articuline 1 contenant le motif VPVP qui constitue la signature des articulines, dans une région distincte de la queue C-terminale qui contient l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal CTS32.

Par ailleurs, chez les ciliés *Euplotes*, les anticorps monoclonaux 4B5F3 (Curtenaz, 1994) et CTS32 (Nahon et al. 1993) décorent les plaques alvéolaires en immunofluorescence. Ces résultats suggèrent qu'en dépit de la prédominance d'une des deux familles chez un modèle donné, les articulines et les épiplasmines peuvent coexister chez un même cilié.

D'après ces résultats, on pourrait suggérer l'existence d'un ancêtre commun de l'épiplasme pour les ciliés.

I.4. Les réseaux de centrines chez *Tetrahymena* et *Paramecium*

Le réseau infraciliaire, également appelé ICL pour *infraciliary lattice*, est un réseau filamenteux, formé de mailles hexagonales sous-tendant la surface cellulaire. Les protéines constituant ce réseau sont les centrines. Deux rôles ont été historiquement décrits pour les

centrines à savoir la duplication des centres organisateurs de microtubules (les MTOCs) et la contraction de structures filamenteuses associés aux MTOCs. Elles peuvent encore jouer un rôle dans la duplication des corps basaux.

Les centrines sont des petites protéines très conservées chez les eucaryotes, liant le calcium via quatre domaines à EF-hand. Ainsi, une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire provoque la contraction brutale de ce réseau (quelques millisecondes) provoquant une diminution de la taille de la cellule d'environ 30% (Deloubresse, 1988 ; Deloubresse, 1991).

Chez *Tetrahymena thermophila*, le génome contient au moins 4 gènes codant pour des centrines de 19 à 20 kDa qui ont une localisation distincte dans la cellule (Stemm-Wolf, 2005). L'isoforme Cen 1 est localisé dans la région proximale des corps basaux où la duplication est initiée, dans la zone de transition entre le corps basal et l'axonème, dans les fibres corticales de l'appareil oral, les fibres cinétodesmales, et les bras internes des doublets microtubulaires de l'axonème. Cette protéine joue un rôle dans la duplication et la maintenance des corps basaux. Parmi les 4 isoformes, Cen2 ne semble pas être exprimée contrairement à Cen3 et Cen4 qui sont localisées dans les corps basaux et au niveau des pores des vacuoles contractiles.

Chez la paramécie, des protéines de 23 à 24 kDa possédant chacune 4 domaines EF-hand permettant de fixer le Ca^{2+} ont été caractérisées et l'analyse de la séquence nucléique de l'une de ces protéines, ICL1a, a montré que ce gène appartient à la famille des centrines (Madeddu, 1996). Trois autres gènes homologues (ICL1b, ICL1c et ICL1d) ont été identifiés et sont co-exprimés avec ICL1a (Vayssie, 1997).

Chez la Paramécie, le réseau des centrines pourrait être un partenaire du réseau épiplasma à l'échelle globale de la cellule, cependant ce n'est pas le cas chez *Tetrahymena* (Guerra, 2003), où il ne reste plus que la structure épiplasma comme candidat pour assurer une fonction intégrative à l'échelle de la cellule.

Chez la paramécie, et avec le séquençage complet du génome, Gogendeau et al., 2007 ont identifié les principaux composants du réseau infraciliaire par une approche protéomique. L'étude précise des rôles de ces composants sera abordée dans le chapitre suivant consacré aux familles multigéniques.

I.5. Morphogenèse Chez *Paramecium*

Comme la paramécie est un organisme à la fois unicellulaire et complexe ; elle constitue par conséquent un excellent modèle pour l'étude, de nombreuses fonctions différenciées. La morphogenèse représente une de ces fonctions.

Chez les organismes multicellulaires, la morphogenèse est plutôt tissulaire tandis que dans le cas de la paramécie, le changement de la forme se fait au sein d'une seule cellule.

On s'est intéressé aux processus morphogénétiques de la Paramécie, car la morphogenèse cellulaire dépend du développement du cytosquelette et d'interactions cytosquelette-membrane.

Chez la paramécie, la division est précédée par la duplication des vacuoles contractiles et l'initiation du nouvel appareil oral qui se développe à la droite de l'ancien. Lors de la division, le nouvel appareil oral s'intègre dans la partie postérieure du sillon de division et s'en éloigne témoignant ainsi de l'allongement de la cellule (Iftode, 1989). Au niveau cortical, lors de la duplication des corps basaux, les écailles épiplasmiques s'accroissent par addition intussusceptive de matériel provoquant un allongement longitudinal de l'outer lattice. Cet allongement est suivi d'une segmentation de la couche épiplasmique et de l'outer lattice conduisant à l'individualisation de deux nouvelles unités corticales. Une régression partielle des fibres cinétodesmales est également observée à la suite de la duplication des corps basaux (Fig.17).

D'autre part, pendant la division, des réseaux de microtubules longitudinaux se mettent en place pour former un cytofuseau dont le rôle serait de maintenir l'organisation des rangées ciliaires pendant la croissance de la cellule.

Le cortex de la paramécie se divise en 5 zones en fonction du nombre de corps basaux par unité corticale et de la duplication ou non de ces unités au cours de la division (fig.18). Dans certaines zones du cortex (zones invariantes 3 et 4), représentant 10% des unités corticales de la cellule, aucune duplication de corps basal n'est observée, contrairement aux autres zones qui présentent une multiplication active des cinétosomes, celle-ci se réalisant en une ou deux étapes.

Une première vague de duplication permettant de doubler le nombre d'unités corticales s'effectue en deux temps : tout d'abord dans l'ensemble des unités corticales des zones 1 et 5 puis uniquement dans la zone 1, dans une région centrale en position ventrale et dans une fine

bande équatoriale en position dorsale. Cette première vague est suivie par une deuxième, dans les zones 1, 2 et 5, pendant laquelle un second corps basal apparaît dans chaque unité corticale.

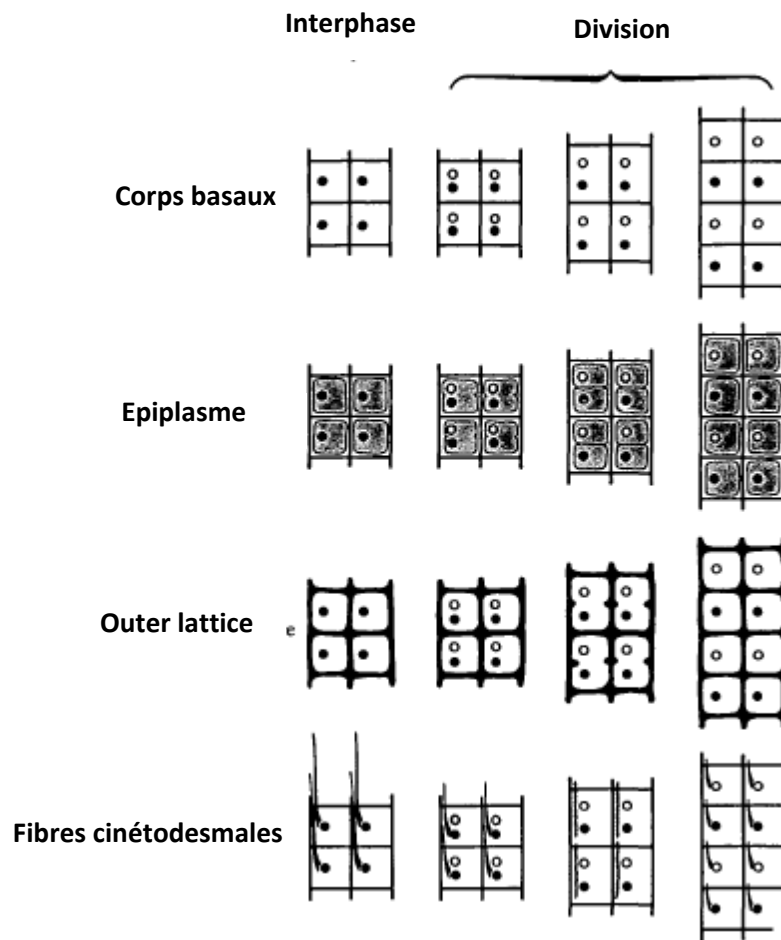


Fig.17 : Événements de morphogénèse corticale chez la paramécie (Iftode et al. 1989). Ce schéma montre la succession des événements que subissent les constituants d'une unité corticale pendant la division de la cellule.

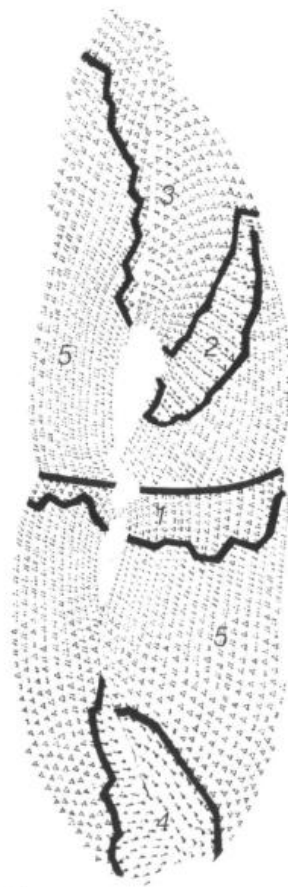


Fig.18 : Représentation schématique des zones corticales chez la paramécie.

(Iftode, 1989)

L'appareil oral apparaît comme un épicentre initial relayé par le sillon de division à partir desquels progressent des vagues morphogénétiques vers les pôles antérieur et postérieur de la cellule. Chez la paramécie, il existe deux facteurs majeurs dans ce programme développemental : 1) les signaux transcellulaires qui induisent la réorganisation, l'assemblage et la duplication des structures ; 2) les réponses différentielles des territoires à la propagation du signal. Ce dernier facteur peut être interprété à l'aide de deux concepts :

- Les différents territoires sont structurellement identiques et leur répartition dépend de la distribution des signaux morphogénétiques.
- La différenciation des territoires est pré-établie et héritée de la division précédente ; les signaux morphogénétiques se propagent de manière homogène dans la cellule.

Préalablement à chaque vague de duplication, les corps basaux s'individualisent dans les unités corticales en formant leurs propres racines ciliaires (Iftode, 2003). Ces auteurs ont montré que le modèle de duplication des corps basaux proposé par Allen (1969) chez *Tetrahymena* est également applicable à *Paramecium*. Tout comme chez *Tetrahymena*, la polarité des corps basaux et de leurs fibres associées serait contrôlée par les anciennes structures pré-existantes.

Chez *Paramecium*, il a été également mis en évidence une migration du nouveau corps basal le long de la fibre cinétodesmale de l'ancien (Iftode, 2003).

Chapitre IV

Familles Multigéniques

Chapitre IV : Familles Multigéniques

En biologie, l'évolution décrit les modifications des êtres vivants. Elle explique la diversification de la vie, de ses premières formes à l'ensemble des êtres vivants actuels par une chaîne de modifications buissonnantes. L'historique de ces modifications est détaillé par la phylogénie, en relation étroite avec la taxinomie. L'évolution est définie par l'interaction entre les modifications au sein de chaque espèce et l'apparition d'espèces nouvelles (spéciation). Ces deux phénomènes sont accompagnés d'extinctions d'espèces ou de taxons.

Le processus évolutif se base sur la diversité existant au sein de chaque espèce. Tout mécanisme susceptible de modifier les caractéristiques d'une population génération après génération est un moteur potentiel d'évolution.

Lorsqu'un ensemble de gènes ont des séquences si semblables qu'ils paraissent tous issus d'un gène ancestral à partir d'une série de duplications, on parlera d'une famille multigénique. En général, les membres d'une famille multigénique résident sur le même chromosome, à proximité les uns des autres. Ils ne sont pas forcément identiques, car après leur duplication, ils commencent à accumuler des différences sous l'effet des mutations. Si les séquences protéiques entre les membres d'un ensemble de gènes diffèrent de plus de 50%, on parlera alors d'une superfamille. Dans ce cas, on suppose que la divergence des gènes est très ancienne, et la superfamille peut comporter différentes familles réparties sur différents chromosomes.

Il se peut aussi que ces familles comprennent des gènes qui ne sont plus fonctionnels, que l'on appelle des pseudogènes, suite à une duplication incomplète ou à une perte ultérieure de fonctionnalité.

Après duplication, un génome possédera 2 copies identiques du même gène. Une des copies sera libre de muter et de diverger, si l'autre copie continue d'assurer la fonction primitive, pour peut-être acquérir de nouvelles fonctions et contribuer à l'évolution.

I. La notion de familles multigéniques

Les familles multigéniques sont constituées d'un groupe de gènes présent dans un même génome, et qui sont tous apparentés. Ce lien de parenté est la conséquence d'un certain nombre de mutations capables de dupliquer la séquence d'un premier gène pour produire deux gènes identiques chez un même individu. Ces gènes peuvent alors évoluer différemment, mais on continuera à détecter leurs liens de parenté pendant très longtemps.

Ce phénomène peut se produire de façon récurrente, et participe de façon significative à l'évolution moléculaire, enfin à l'évolution tout court.

Les génomes des espèces sont des archives. Ils permettent d'imaginer les événements génétiques moléculaires de l'évolution qui ont conduit à des innovations, à leur diversification et à leur complexification (familles multigéniques, gènes chimères...).

II. Duplication « small-scale » versus duplication « large scale »

Dans les populations, les gènes sont en flux constant, ils peuvent être gagnés à travers la duplication. Suite à celle-ci, il y a deux situations possibles : les gènes peuvent être retenus d'une façon occasionnelle ou ils sont fréquemment éliminés.

Roberstson et al. ont comparé les dupliquats générés par des duplications «small-scale» essentiellement caractérisées par la duplication d'un seul gène (SSD) « Small Scale Duplication » avec ceux générés par les duplications de la totalité du génome (WGD) « Whole Genome Duplication » qui font intervenir la duplication du génome entier chez la levure «*Saccharomyces cerevisiae*» (Hakes et al. 2007).

Comme les dupliquats provenant de la duplication du génome entier partagent plus d'interactions entre eux et pourraient être apparentés fonctionnellement, ces dupliquats semblent être plus dispensables que les dupliquats provenant de la duplication d'un seul gène.

Pour étudier cette hypothèse, les différents dupliquats ont été analysés en utilisant des expériences de Knockout de gène. En effet, les auteurs constatent que la délétion d'un gène issu d'une duplication du génome entier a un effet phénotypique plus faible que celui obtenu après la délétion d'un gène issu de la duplication d'un seul gène. De plus, la proportion des

gènes essentiels issus de la duplication du génome entier est bien moindre que celle des gènes issus de la duplication d'un seul gène.

On peut déduire que cette différence entre les deux types de duplication est probablement un résultat des différentes forces de contraintes imposées suite aux effets de balance et de dosage des protéines (stœchiométrie dans l'expression des protéines).

Robertson et al. suggèrent par cette étude que les gènes qui ont des contraintes fonctionnelles, c'est-à-dire ceux qui ont une forte expression et ceux qui sont vitaux, sont les types de gènes qui apportent une plus forte contribution à l'innovation fonctionnelle.

Cette étude nous amène à poser la question suivante: les gènes vitaux pour la cellule contribuent-ils majoritairement au processus de néofonctionnalisation? Ainsi, on parle de néofonctionnalisation dans le cas où les gènes dupliqués permettent l'apparition d'une nouvelle fonction à l'organisme en accumulant des mutations qui sont conservées par sélection.

III. Etude des familles multigéniques chez *Paramecium tetraurelia*

Le génome de la paramécie a été complètement séquencé et annoté par le Génoscope à l'initiative d'un groupe européen (GDR) (Aury 2006). A peu près 40 000 gènes ont été identifiés.

Ce nombre de gènes est la conséquence d'une histoire évolutive du génome qui permet de montrer que le génome de la paramécie a subi au moins trois duplications globales, toutes successivement suivies de délétions de gènes. Par ailleurs, ce séquençage a révélé une incroyable diversité de protéines du cytosquelette dont on a parlé dans le troisième chapitre de la bibliographie et qui forment des familles multigéniques : centrines, striatines, actines, épiplasmines; la disponibilité des séquences a permis de réaliser des expériences de génomique fonctionnelle pour essayer de comprendre le rôle de ces familles.

III.1. Etude de la famille multigénique des centrines

La paramécie possède 49 gènes de centrines parmi lesquels 9 n'ont pas une fonction déterminée. Les produits de 35 gènes ont été identifiés dans «l'Infraciliary lattice» par une approche protéomique (Gogendeau, 2007). Quatre gènes sont spécifiques du corps basal et le dernier est impliqué dans le canal ciliaire de Ca^{2+} (Gonda et al. 2004).

Des comparaisons de séquences ont permis de montrer que les centrines du réseau infraciliaire (Icl) se répartissent en 10 sous familles (Icl1a, Icl1e, Icl3a, Icl3b, Icl5, Icl7, Icl8, Icl9, Icl10 et Icl11).

Les protéines au sein de chaque sous famille partagent plus de 85% d'identité et 90% de similarité entre elles.

Aucun homologue des protéines des sous familles Icl7p, Icl8p, Icl3b-p, Icl10p et Icl11p n'a pu être identifié chez d'autres organismes, alors que des homologues des centrines des familles Icl1ap, Icl3a, Icl5p et Icl9p sont présents chez les ciliés et en particulier chez *Tetrahymena*. Des homologues des centrines de la sous famille Icl1e sont conservés chez les ciliés mais aussi chez les apicomplexes.

Pour aborder les fonctions de ces différentes protéines, Gogendeau et al. ont analysé la fonction de chaque sous famille des centrines par le mécanisme d'ARN interférence, ils ont induit l'ARN interférence par la méthode de « feeding » (Timmons et Fire1998) ; (Galvani et Sperling 2002).

Ils ont alors localisé *in vivo* un représentant de chacune de ces sous familles de protéines en fusionnant ces dernières avec la GFP (Gogendeau 2007).

Les protéines fusionnées à la GFP se localisent toutes au niveau du réseau infraciliaire comme Icl1ap, à l'exception de Icllep et Icl10ap qui apparaissent en pointillés le long des mailles de l'Infraciliary lattice. De même, Icl1ep est également présente au niveau des corps basaux et des pores des vacuoles pulsatiles (fig.19).

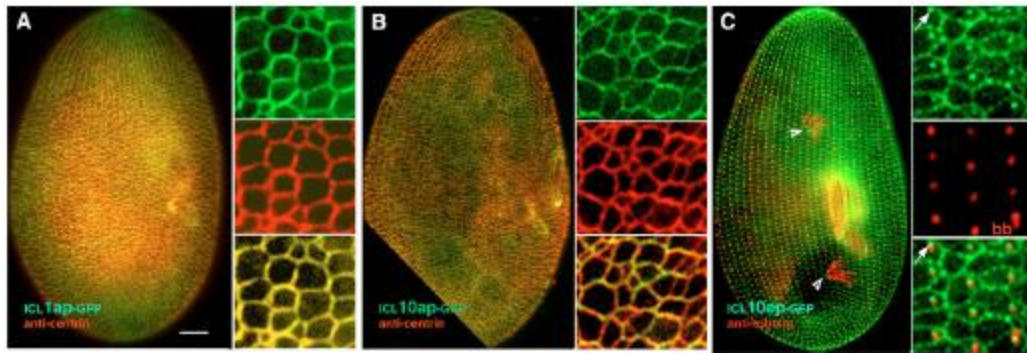


Fig.19 : Différentes localisations des centrines fusionnées à la GFP (Gogendeau 2007).

Pour un représentant de chaque sous-famille des centrines, la localisation a été déterminée dans les cellules exprimant la GFP, fixées et double marquées avec l'anticorps polyclonal anti-GFP (vert) et avec un autre anticorps monoclonal anti-centrine « 1A9 » spécifique pour l'Infraciliary lattice (rouge) ou avec un anticorps monoclonal « ID5 », qui marque essentiellement les corps basaux (rouge). A droite de chaque cellule représentée, les encarts montrent, du haut en bas, la GFP, le marquage par l'anti-centrine ou l'anti-tubuline et une fusion des deux marquages. A- Dans les cellules exprimant ICL1ap-GFP, les deux marquages se localisent. B- Dans les cellules exprimant ICL10ap-GFP, le marquage par la GFP montre une forme en perles, tandis que le marquage par l'anti-centrine est continu tout au long des mailles. C- Dans les cellules exprimant ICL10ep-GFP, le signal GFP se localise non seulement à l'ICL sous forme de perles, mais aussi dans les vacuoles contractiles « têtes de flèches », et antérieurement, en étroite association avec les corps basaux.

D'autre part, les expériences d'extinction génique ont permis de montrer que les inactivations de ces différentes sous familles provoquent un désassemblage du réseau confirmant ainsi leur rôle essentiel dans le maintien de son intégrité.

Toutefois, il faut signaler qu'il y a trois modes différents du désassemblage selon la sous famille éteinte malgré l'obtention d'un même phénotype final (fig.20).

Par exemple, les cellules subissant le RNAi de Icl17p observées après 24 heures et 48 heures de croissance montrent un désassemblage homogène du réseau infraciliaire (fig.20A) ; dans le cas de RNAi Icl10ap, il y a un amincissement des filaments précédant le désassemblage (fig.20B) et dans les cellules qui ont subi le RNAi de Icl3d, des agrégats de l'Icl accompagnent le désassemblage (fig.20C).

Cela suggère qu'il n'y a pas une redondance fonctionnelle entre les différentes sous familles des centrines, dans ce cas, on peut supposer qu'il y ait eu une néofonctionnalisation acquise par les différents isoformes de centrines suite à la duplication du génome chez la paramécie.

Le fait que la déplétion de chaque sous famille de centrines ne puisse être compensée par la présence d'un autre isoforme suggère soit que la stœchiométrie entre les différents isoformes de centrines est essentielle au maintien du réseau, soit que ces protéines ne sont pas isofonctionnelles.

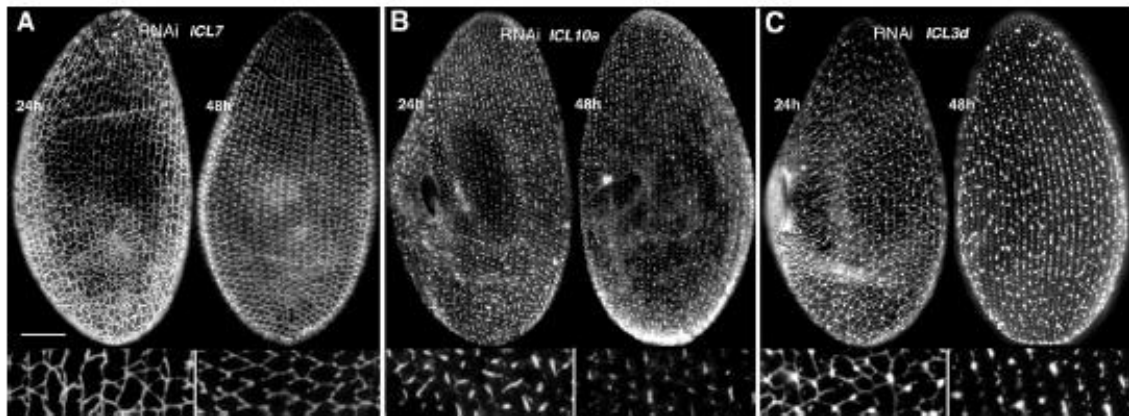


Fig.20 : Les effets de la délétion des centrines semble être spécifique pour chaque sous famille (Gogendeau 2007).

Pour toutes les centrines (à l'exception de l'ICL8p), le RNAi induit un désassemblage complet de l'ICL observé après division cellulaire. Malgré le même phénotype terminal atteint dans la plupart des cas (absence de l'ICL), le désassemblage observé à travers les premières divisions sous les conditions de RNAi, dépend de la sous-famille ciblée.

Par ailleurs, l'extinction des centrines de la sous famille Icl, conduit non seulement au désassemblage du réseau mais également à des défauts de positionnement des vacuoles pulsatives et des corps basaux (fig.21). Les défauts observés au niveau des corps basaux sont semblables à ceux précédemment décrits après inactivation des centrines centriolaires PtCen2ap et PtCen3ap de paramécie (Ruiz et al. 2005).

D'après cette étude, il a été montré que les différents isoformes des sous familles se localisent dans l'ICL et qu'ils pourraient accomplir des fonctions spécialisées dans l'assemblage, la stabilité et la contractilité du réseau aussi bien que son architecture globale.

La présence de l'Icl1ep dans deux localisations différentes autre que l'ICL (dans les pores des vacuoles contractiles et les corps basaux) suggère un rôle de coordination entre l'ICL et les différentes organelles corticales.

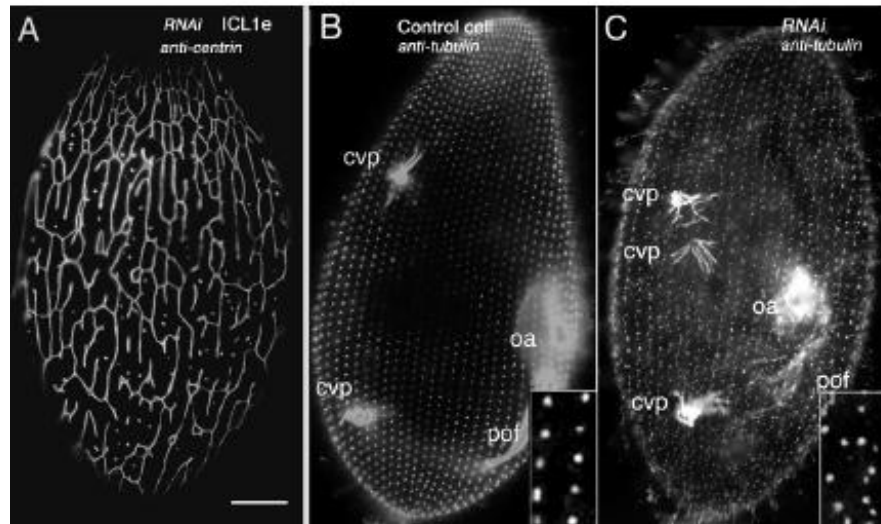


Fig.21 : effets de la déplétion d'Icl1ep par le mécanisme de RNAi (Gogendeau 2007). Les cellules sont marquées ou bien avec l'anti-centrine 1A9 pour visualiser l'ICL (A) ou bien avec un anticorps anti-tubuline ID5 pour visualiser les structures microtubulaires et en particulier les corps basaux (B-C). A- Désassemblage de l'ICL après 24 heures de la délétion de l'Iclep montre une forme différente de celle observée dans la figure 14. C- Désorganisation du cortex, observé après 48 heures. La comparaison avec la cellule contrôle (B) montre que la délétion de l'Iclep aboutit à des corps basaux mal alignés, et à un nombre anormal des pores des vacuoles contractiles.

III.2. Etude fonctionnelle de la famille multigénique des striatines

Chez la paramécie, les corps basaux, au cours de leur maturation acquièrent des appendices (déjà décrit dans le chapitre III : les systèmes microtubulaires chez la paramécie).

Par des analyses de spectrométrie de masse, Aude Espigat a identifié 6 familles de protéines composantes des fibres striées chez la paramécie. Ces familles ont été appelées **Striatine 1 à 6** (Thèse de doctorat de l'université Paris 6, Septembre 2006).

Pour étudier la fonction de ces fibres striées, Aude Espigat lors de son travail de thèse a induit l'ARN interférence par la méthode de « feeding ».

En utilisant un anticorps polyclonal anti-Kd (Kd : fibre Kinétodesmale) sur les cellules sauvages, les fibres striées forment un réseau longitudinal continu le long des rangées ciliaires. Après 24 heures d'ARN interférence, les cellules ayant subi le RNAi présentent un réseau discontinu mais qui reste aligné le long des cinéties.

Cette analyse fonctionnelle a montré que la striatine 6 est nécessaire pour la mise en place du réseau de fibres striées chez la paramécie.

A travers cette analyse, il a été montré que les fibres striées sont nécessaires au positionnement et à l'orientation des corps basaux. Les corps basaux mal positionnés, semblent néanmoins fonctionnels car ils sont capables de recréer leur environnement cytosquelettique local et la ciliogenèse ne semble pas être affectée.

De même, il a été montré que la déplétion de la striatine 6 induit des défauts d'organisation du cytofuseau qui est un réseau microtubulaire transitoire. Cela suggère l'implication des fibres striées dans cette organisation, même si la perte d'alignement des corps basaux pourrait également l'influencer.

Il faut noter que pour cette famille multigénique de striatine, juste une sous famille « la Striatine 6 » a été analysée, donc pour savoir si les 6 striatines sont toutes nécessaires à la structure, il faudrait envisager d'effectuer une série d'expériences pour montrer les fonctions d'autres striatines et savoir par la suite si elles ont des fonctions différentes ou similaires à celles de la striatine 6.

III. Etude de la famille multigénique des actines

Chez la paramécie, Sehring et al. ont identifié 9 sous-familles des gènes d'actines. Ces différents paralogues d'actine ont été localisés en surexprimant des protéines de fusion GFP-actine. Le mécanisme d'ARN interférence par feeding a été utilisé pour étudier les fonctions de ces paralogues d'actine (Sehring et al. 2007).

Premièrement, concernant la localisation, certaines actines de la sous famille 1 forment des queues à la surface des vacuoles digestives, et semblent impliquées dans les mouvements de cyclose, d'autres montrent une fluorescence diffuse à travers le cytoplasme ou forment des pièces rapportées aux vacuoles digestives (fig.22).

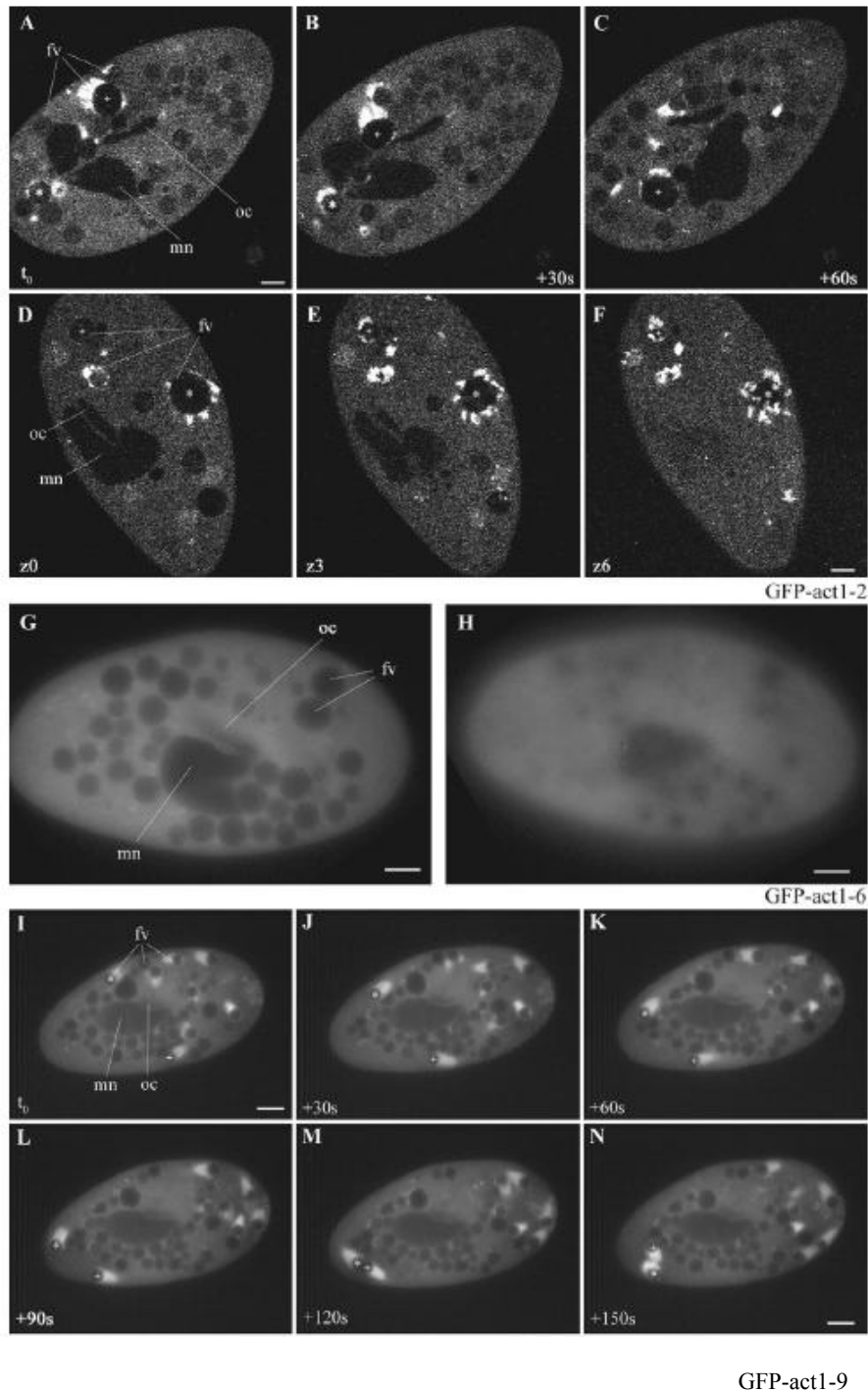


Fig.22 : La localisation par GFP des membres de la sous famille 1 d'actine (Sehring, 2007):
 (A-C) Une série des cellules transformées avec GFP-act1-2 observées au microscope confocal montre la formation des queues à la surface des vacuoles digestives. (D-F) une deuxième série des cellules transformées avec GFP-act1-2- montre la distribution irrégulière des pièces rapportées aux vacuoles digestives. (G, H) la transformation des cellules avec GFP-act1-6 montre une distribution diffuse à travers le cytoplasme sans aucune localisation spécifique. (I-N) dans les cellules transformées avec GFP-act1-9 des queues à la surface des vacuoles digestives ont été observées.

De même, la transformation des cellules de la paramécie avec la GFP d'un membre de la sous famille 3 (GFPact3-1) montre un marquage diffus dans le cytoplasme de la cellule.

Pour améliorer la fluorescence de la GFP, ils ont utilisé un anti-GFP, ils remarquent que GFP-act3-1 décore les cils, le cortex, les phagosomes et le cytosol.

Pour les actines de la sous famille 4, la localisation en utilisant la GFP n'est pas possible car les cellules meurent après la microinjection dans le macronoyau. Pour cela, un anticorps polyclonal a été généré contre 160 résidus d'un peptide de l'actine appartenant à la sous famille 4 et cela pour obtenir un anticorps spécifique contre cette sous famille.

Ainsi, cet Anticorps décore la cavité buccale, le pourtour des vacuoles digestives néoformées, aussi bien les cils et le cortex cellulaire. Le marquage le plus frappant est celui du sillon de division, pour lequel l'actine 4 reste associée depuis le premier stade de division jusqu'à la fin de la fission.

D'autre part, en transformant les cellules de la paramécie avec GFPact5, ils remarquent la formation d'un fin anneau à la surface des vacuoles digestives, ce marquage n'existe pas autour de toutes les vacuoles digestives. Il est à noter que la même localisation est obtenue avec l'anticorps act5-1, cette actine se localise aussi bien dans le cortex, la cavité orale et les filaments oraux.

La même localisation a été trouvée avec l'actine 8-1, de plus, en se focalisant à la surface des cellules transformées, ils ont trouvé des rangées régulières de petits points sous la membrane plasmique qui peuvent être les sacs parasomaux qui correspondent aux sites stationnaires pour l'exocytose et l'endocytose (Allen et al. 2000; Plattner et al. 2003).

Enfin, les actines 6-1 se localisent dans le compartiment cytosolique et les actines 2-1 se localisent dans ce dernier et dans les cils.

Deuxièmement, Sehring et al. ont montré les effets de RNAi des sous familles d'actine sur la forme cellulaire et sur plusieurs aspects physiologiques.

Ainsi, les membres d'actine des sous familles 1,5, 6 et 8 n'ont aucun effet sur les aspects fonctionnels examinés.

Par contre, concernant la forme cellulaire, la sous famille 4 soumise à ce mécanisme montre une forme Boomerang, la sous famille 7 montre une forme appelée « Dolphin » et la sous famille 9 montre une forme triangulaire (fig.23).



Fig.23 : Phénotypes obtenus avec les cellules subissant le RNAi d'act4, act7 et act9 respectivement (Sehring et al. 2007).

Concernant la nage, les cellules qui ont subi le RNAi de l'actine 2 et de l'actine3 nagent lentement et le RNAi de l'act 4 et 9 nagent en faisant des cercles.

Quant à l'exocytose, seul le RNAi de l'act4 a une capacité exocytotique réduite à 10%.

La phagocytose est réduite à 30% dans le RNAi de l'actine 1,2, 3, elle est nulle dans le RNAi de l'act4 et elle est de 70% pour les cellules subissant le RNAi de l'actine 9.

Donc, d'après Sehring et al., on peut conclure que l'actine est une protéine ubiquitaire dont les isoformes sont adressés à des localisations plus ou moins spécifiques et dont le RNAi induit des phénotypes divers et dont un est le phénotype « boomerang ». Dans le cas de ce phénotype, ils ont remarqué que l'exocytose est réduite à 10% suggérant que le phénotype de RNAi de l'actine 4 est dû à des effets indirects qui pourraient être dûs à des altérations dans le système cortical. En même temps, il faut savoir que c'est un phénotype spécifique d'un seul gène d'actine car ils ne l'ont pas obtenu avec les RNAi des autres gènes d'actine.

RNAi

	Localisation par la GFP	Localisation par	Forme cellulaire	Exocytose	Nage
Act1-2	phagosomes		normale	100%	normale
Act1-4	cytosol				
Act1-6	cytosol		normale	100%	normale
Act1-9	phagosomes		normale	100%	normale
Act2-1	cytosol et cils		normale	100%	lente
Act3-1	cortex, phagosomes, cils et cytosol		normale	100%	lente
Act4	pas de localisation	cortex, cavité orale, cils et sillon de division	boomerang	<10%	circulaire
Act5-1	cortex, cavité orale, filaments oraux, phagosomes	cortex, cavité orale, filaments oraux, phagosomes, cils	normale	100%	normale
Act6-1	cytosol		normale	100%	normale
Act7			dolphin	100%	normale
Act8-1	cortex, cavité orale, filaments oraux, phagosomes		normale	100%	normale
Act9			triangle	100%	circulaire

Tableau résumant les différentes localisations des représentants des 9 sous familles d'actine et les effets obtenus suite au mécanisme de l'ARN interférence.

III.4. Etude de la famille multigénique des tubulines

Chez *Paramecium tetraurelia*, l'analyse de la famille de gènes de tubulines a révélé l'existence de deux gènes de α -tubuline et de trois gènes de β -tubuline.

La présence de γ -tubuline et son association permanente avec les corps basaux a été observée premièrement chez *Tetrahymena thermophila* et *Paramecium tetraurelia* en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre des parties conservées phylogénétiquement de cette protéine (Liang et al. 1996).

Tetrahymena thermophila contient une seule copie du gène γ -tubuline « *GTU* » qui est essentiel (Shang et al. 2002).

Chez *Paramecium tetraurelia*, il y a deux gènes de γ -tubuline « γ *PT1* et γ *PT2* » : l'inactivation des gènes de γ -tubuline inhibe la duplication des corps basaux (Ruiz, 1999).

A part les gènes conventionnels de tubulines « α , β , γ », de nouveaux membres de la famille de tubulines a été décrite chez *Paramecium tetraurelia*.

Le premier membre caractérisé est le gène δ *PT1* (Ruiz et al. 2000). L'inactivation de ce gène aboutit à la perte du tubule C dans les corps basaux mais elle n'a pas d'effet sur la ciliogenèse. Il y aurait donc des effets structuraux mais pas d'effets fonctionnels, en tout cas non détectés.

Si cette déficience n'affecte pas directement la duplication des corps basaux, elle est quand même importante car elle perturbe l'architecture du cytosquelette cortical, aboutissant progressivement à des corps basaux mal positionnés qui vont être perdus puis à l'altération de la forme et de la taille de la cellule.

Un autre composant se localisant dans les corps basaux est le ε -tubuline.

Le gène ε -tubuline « ε *PT* » est essentiel pour l'assemblage et l'ancrage des corps basaux, la délétion de ce gène par le mécanisme d'ARN interférence aboutit à la réduction du nombre des corps basaux et à la désorganisation de ces derniers dans le cortex et l'appareil oral.

Donc, le produit du gène ε -tubuline « ε *PT* » joue à peu près le même rôle que le produit du gène δ -tubuline à savoir que l'effet de ce dernier est plus sévère que celui de ε -tubuline, et il

faut être prudent car l'inactivation était faite par le mécanisme d'ARN interférence dont l'efficacité dépend de plusieurs facteurs.

Ces changements n'apparaissent pas immédiatement, ils évoluent durant les différents cycles cellulaires. L'arrêt drastique et immédiat de la duplication des corps basaux causé par le « silencing » de γ -tubuline crée un contraste suggérant que ε -tubuline pourrait être impliquée à un stade avancé dans la biogenèse des corps basaux (Dupuis-Williams et al. 2002).

A part cette suggestion, on peut imaginer qu'il n'y a pas de redondance et que ε -tubuline n'arrive pas à compléter le rôle joué par γ -tubuline.

Le gène nommé originalement « *SM19* » a été identifié comme codant pour la η -tubuline.

Les mutations de ce gène aboutissent à une réduction progressive dans le nombre des corps basaux, accompagnée par une réduction de la longueur cellulaire et la modification de la forme cellulaire (Ruiz et al. 1987). Les cellules mutantes montrent une délocalisation de γ -tubuline.

Cette délocalisation suggère que η -tubuline pourrait attacher le complexe de γ -tubuline au site de nucléation des corps basaux (Ruiz et al. 2000). Se pose alors la question suivante : est-ce que les effets obtenus par les mutations du gène « *SM19* » sont dûs juste à ce gène ou y-a-t-il des effets additionnels indirects provenant de γ -tubuline, comme cette dernière a été délocalisée.

Les bases des données ont été complétées par les séquences de θ , ι et κ tubulines chez *Paramecium* Spp., les analyses phylogénétiques de ces séquences ont montré que κ -tubuline est groupée avec α -tubuline tandis que θ -tubuline appartient à la branche de β -tubulin (Dutcher 2003).

Cependant le rôle de ces tubulines mineures dans l'architecture cellulaire et l'organisation du réseau microtubulaire reste inconnu.

Cette étude de la famille multigénique des tubulines chez la paramécie montre que les produits de ces gènes apparentés ont des rôles différents et qu'ils ne sont pas redondants, donc on peut parler de la néofonctionnalisation suite à la duplication des gènes.

IV. Conclusion

Le fait que la délétion par le mécanisme d'ARN interférence de chaque sous famille composant chacune de ces familles multigéniques du cytosquelette ne puisse être compensée par la présence d'une autre isoforme suggère soit que la stœchiométrie entre les différents isoformes de ces familles multigéniques est essentielle au maintien de la structure, soit que ces protéines ne sont pas isofonctionnelles.

Pour essayer de répondre à la question évoquée plus haut concernant la néofonctionnalisation après duplication du gène, on peut suggérer que la duplication du génome chez la paramécie a contribué à générer des familles multigéniques dont les différents membres ont apparemment évolué indépendamment des autres. Dans ce cas, on pourrait parler d'une néofonctionnalisation suite à la duplication du génome car les produits de ces gènes apparentés n'ont pas le même rôle. Cela est vrai aussi bien dans le cas des centrines et des actines dont les différentes protéines correspondantes montrent des localisations et des fonctions différentes.

Cela est vrai aussi dans le cas de la famille multigénique des tubulines, là où chacun des produits des gènes a un rôle différent de l'autre.

A savoir que dans le cas des centrines, il a été montré que les différentes sous-familles présentes dans le réseau infraciliaire ont des fonctions spécifiques.

Il reste à déterminer si c'est également le cas des différentes protéines constituant une seule sous-famille.

Donc, suite à la duplication du génome chez la paramécie, une part importante des gènes a été retenue, non pas juste pour respecter les effets de balance et de dosage des protéines mais pour favoriser la néofonctionnalisation qui pourrait être un des éléments contribuant à l'évolution en Biologie.

Résultats Expérimentaux

Chapitre I : Analyse structurale de la famille multigénique des Epiplasmines

I. But du travail

L'épiplasme chez la paramécie est une structure du cytosquelette sous-membranaire qui a longtemps intrigué les scientifiques. L'étude de sa composition biochimique réalisée par (Coffe et al. 1996), a permis de déterminer les conditions de solubilisation de ces protéines, appelées épiplasmiques, ainsi que celles nécessaires à leur assemblage *in vitro* en agrégats filamenteux ou amorphes.

Il a été montré au cours du travail de thèse de S. Pomel que les épiplasmiques formaient une famille multigénique de 41 membres (Pomel et al. 2006). L'analyse fonctionnelle de cette famille multigénique, par la technique de l'interférence ARN, a permis l'obtention de phénotypes spectaculaires. En effet, il a été montré que la suppression de l'épiplasmique 2 par le mécanisme de RNAi engendre un avortement de la division cellulaire qui se traduit d'abord par un changement de la forme de la Paramécie qui prend une forme de boomerang. Par la suite, des tentatives de séparations cellulaires successives toujours avortées, conduisent à la formation d'une cellule géante possédant, entre autre, plusieurs bouches. A ce stade de l'analyse, il était donc montré que l'épiplasmique 2 avait une importance fonctionnelle dans la réussite de la morphogenèse de division.

Le travail de cette thèse consiste à analyser plus finement cette famille multigénique. Dans une première partie, nous chercherons à montrer l'organisation de cette famille multigénique, étendue à de nouveaux membres et à la confronter à l'histoire évolutive du génome de *P. tetraurelia*. Dans une seconde partie, le rôle des différentes épiplasmiques sera abordé par différentes approches fonctionnelles facilement utilisables chez la Paramécie comme l'ARN interférence et la localisation de protéines couplées à la GFP.

II. Etude structurale de la famille multigénique des épiplasmiques

L'étude d'une famille multigénique possédant de très nombreux membres n'est pas une démarche simple. Il nous fallait choisir une progression logique pour décortiquer les différents constituants de cette famille et essayer de trouver les pistes qui pourraient nous guider vers les approches fonctionnelles pertinentes concernant les épiplasmiques et leur association en épiplasme chez *P. tetraurelia*.

Pour dégager une issue logique dans l'étude de cette famille, nous avons au préalable effectué une étude structurale détaillée de cette famille.

II.1. Mise à jour du cladogramme de la famille multigénique des épiplasmines

La famille des épiplasmines était constituée de 41 membres. 10 séquences supplémentaires ont été rajoutées en réalisant un Blast sur les dernières mises à jour de la banque de données génomique (*Paramecium* DB <http://Paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/>) (Aury 2006). Cette recherche utilise les critères décrit par (Pomel et al. 2006) et se base essentiellement sur le domaine central conservé de toutes les épiplasmines.

Une analyse Blast réalisée sur le génome d'un autre cilié *Tetrahymena thermophila* (*Tetrahymena* Genome Database (TGD)) (Eisen et al. 2006) avec les mêmes critères de Blast nous a permis de trouver deux nouvelles séquences, qui s'additionnent aux deux déjà décrites par (Pomel et al. 2006). Pour distinguer ces 4 séquences orthologues, nous avons décidé de les nommer Epi Tn (1, 2, 3, et 5) chez *Tetrahymena*.

Un coaligement par ClustalW a été réalisé avec les 51 séquences d'ADN de *P. tetraurelia* et les 4 séquences de *Tetrahymena*. Ce coaligement avait pour but d'étudier les parentés entre ces séquences.

En général, l'étude des parentés entre séquences est réalisée par la phylogénie en vue d'étudier l'évolution des organismes vivants.

L'arbre phylogénétique présente les relations de parenté entre organismes vivants. Il montre qui est proche de qui, et non pas qui descend de qui. Il permet d'identifier les homologies et les homoplasies. La proximité des branches de cet arbre représente le degré de parenté entre les taxons, les nœuds des ancêtres communs de ces taxons. La longueur des branches représente la distance génétique entre taxons, constituant une clef pour comprendre les phénomènes évolutifs. L'étude de phylogénie implique un calcul de distances entre les organismes en utilisant des algorithmes spécifiques et reconstruit par la suite les événements évolutifs qui ont eu lieu. Cette approche phylogénétique peut-être utilisée pour comparer des séquences protéiques ou nucléiques. Elle est en général très efficace lorsque les séquences comparées présentent des taux d'identités supérieurs à 40%.

Dans le cas des épiplasmines, la divergence des séquences est telle que la détermination de positions homologues et donc l'alignement entre séquences devient problématique.

L'utilisation d'un logiciel de phylogénie tel que PHYLIP permet de construire un arbre de similarité sans toutefois donner d'information de parenté entre séquences. En Figure 24 est représenté un arbre de similarité obtenu en utilisant la séquence de l'Epi T5 comme un groupe d'ancrage. Cette analyse, utilisant la totalité des séquences confirme les résultats précédemment obtenus avec le coaligement des domaines centraux des 41 épiplasmines déjà connues et complète la description de cette famille. Cette approche apporte des notions de distances relatives entre les différentes épiplasmines et propose une topologie remarquable de l'arbre généré.

Aux 4 groupes déjà identifiés s'ajoute un cinquième groupe contenant 4 séquences d'épiplasmines de petite taille: Epi 48, Epi 49, Epi 50 et Epi 51. Chacun de ces cinq groupes peut être subdivisé en deux sous groupes : a et b. Parmi les groupes 1, 2 et 3, chaque sous-groupe est composé de 6 membres dont les liens de similarité définissent une topologie dite « 4+2 » où l'on peut observer 4 séquences très conservées et faiblement éloignées des deux autres.

Ces groupes qui représentent 75% des séquences d'épiplasmines sont clairement distants des groupes 4 et 5.

Chez *Tetrahymena thermophila*, à l'exception de l'Epi T5 qui présente une similarité avec les épiplasmines du groupe 5, les épiplasmines de *Tetrahymena thermophila* ne semblent pas être clairement associées aux groupes 1 à 4. Cela reflète une grande divergence de séquences entre les épiplasmines des deux ciliés, malgré la conservation des domaines centraux.

Les branches de l'arbre se terminent en général par 2 épiplasmines qui sont les 2 copies issues de la dernière duplication du génome entier de la paramécie (WGD). Seules 5 séquences sont orphelines : Epi 38, Epi 39, Epi40, Epi 45, et Epi 47.

Les informations qu'on obtient par cette analyse basée sur des comparaisons de séquences sont limitées. Pour mieux décrire et comprendre les parentés entre les différentes séquences d'épiplasmines, nous avons utilisé d'autres outils, et cherché à corréliser leurs apports avec cette première analyse pseudo-phylogénétique. Une information de parenté peut être apportée par une analyse de la synténie des gènes. La notion de synténie est utilisée pour décrire la conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces apparentées. Dans le cas privilégié de la paramécie où il y a eu au moins 3 duplications du génome (Aury et al. 2006). On utilise la synténie pour reconstruire ces génomes et déterminer les parentés entre les gènes d'un même génome dupliqué au moins trois fois.

Pour les épiplasmines, ces liens sont représentés par des traits rouges sur l'arbre. On met en évidence les relations entre les différents gènes paralogues de l'arbre, liés par des nœuds successifs et correspondants au moins aux trois dernières duplications du génome (fig.24, cercles bleus).

En conclusion, la corrélation de la topologie arbre avec les liens de synténie, permet d'obtenir un arbre phylogénétique de parentés entre les épiplasmines. Cette corrélation permet d'envisager l'histoire des épiplasmines comme un bon marqueur de l'histoire du génome de la paramécie.

Les nœuds représentés par les cercles bleus sur l'arbre correspondraient à l'ancienne duplication « old duplication » du génome de la paramécie définie par Aury et al., tandis que les noeuds séparant les sous groupes (fig. 24, cercles rouges) pourraient être associés à la très ancienne duplication « ancient duplication » qui n'est pas fermement confirmée par Aury et al..

En se basant sur ces informations, on peut proposer une interprétation sur le statut des séquences orphelines Epi 38, et Epi 40 comme un résultat de perte de leurs gènes paralogues après duplication du génome. Dans le groupe 4, en comparant le statut de l'Epi 40 avec celui de l'Epi 3 et l'Epi 4, l'analyse de synténie prouve l'existence de parenté entre ces trois épiplasmines. Par contre, l'analyse de synténie ne montre aucune relation de parenté de l'Epi 39 avec les Epi 10 et Epi 11, comme cela pourrait être suggéré par la topologie de l'arbre. On peut suggérer que lors de la comparaison des environnements génomiques, cette Epi 39 pourrait être localisée aux extrémités des contigs et de ce fait aurait échappé à l'analyse.

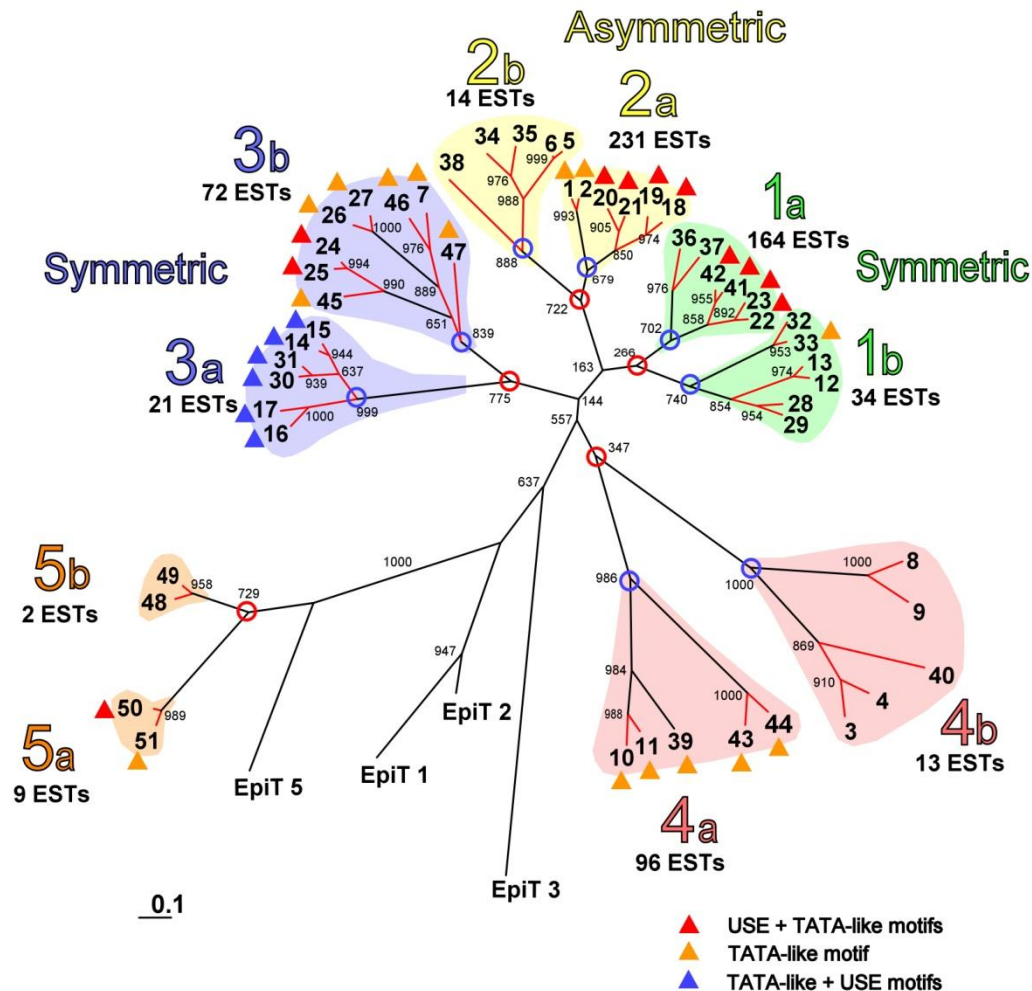


Fig. 24: Analyse comparative des épiplasmiques de *Parametecium tetraurelia* et de *Tetrahymena thermophila* en utilisant l'alignement des séquences d'ADN. Cinq groupes (1 à 5) sont distingués, basés sur la longueur des nœuds. Selon HCA, les groupes 1, 3 and 5 se regroupent en 30 épiplasmiques symétriques et le groupe 2 représente 11 épiplasmiques asymétriques, le groupe 4 représente 10 épiplasmiques appelées Atypiques dans le sens qu'elles n'ont pas des domaines structuraux communs avec les épiplasmiques symétriques et asymétriques. Le résultat de l'analyse de la synténie est indiqué en rouge sur la topologie de l'arbre. Les nœuds correspondants aux duplications « ancien » et « old » du génome entier (WGD) sont cerclés en rouge et en bleu respectivement. Les nombres des ESTs ont été compilés pour chaque sous-groupe. La présence de TATA-like et des motifs «USE» dans la partie 5'UTR des gènes d'épiplasmiques est signalée avec des triangles : orange pour le motif TATA-like, rouge ou bleu quand le motif est précédé ou suivi par un motif « USE ».

II.2. La méthode HCA « Hydrophobic Cluster Analysis » utilisée pour étudier les structures des épiplasmiques.

L'analyse précédente, basée sur les similarités des séquences, a regroupé 75% des séquences des épiplasmiques en 6 sous-groupes. Cette topologie basée sur l'analyse informatique n'a fourni aucune information essentielle concernant les caractéristiques structurales spécifiques de chacun de ces sous-groupes. Pour cela, on peut confronter les données obtenues sur la parenté par une analyse plus structurale des protéines en utilisant la méthode « HCA » pour « Hydrophobic Cluster Analysis ».

La méthode « HCA » développée par Jean Paul Mornon en 1987, est décrite par Callebaut et al. en 1997 comme une méthode de prédiction des structures secondaires des protéines. Le pouvoir prédictif de cette méthode est lié à l'exploitation du mécanisme du repliement des protéines, à savoir une partition entre un cœur hydrophobe et une surface hydrophile. Selon cette méthode, la séquence d'une protéine peut être représentée par un tracé bidimensionnel qui met en évidence les amas de résidus hydrophobes.

La méthode permet de manière générale, d'aligner les séquences de protéines ayant de faibles taux d'identité (en dessous de 25-30%) là où les méthodes classiques d'alignement sont basées uniquement sur la maximalisation de scores d'identité ou de similitude. Pour les analyses HCA, on considère deux catégories d'acides aminés, les hydrophobes (V, I, L, F, W, M, Y) et les autres. Les séquences sont représentées sur un support hélicoïdal de façon à considérer l'environnement de chaque acide aminé. On peut alors constater que les acides aminés hydrophobes ne sont pas distribués au hasard mais tendent à se regrouper en amas.

La forme de l'amas hydrophobe est généralement liée à la nature de la structure secondaire régulière. Ainsi un amas de type vertical, donc court dans le sens de la progression de la chaîne polypeptidique, est souvent représentatif de brin β , à l'opposé d'amas horizontaux correspondant plutôt à des hélices.

Les résidus hydrophobes sont très enfouis formant le cœur de la protéine et sont largement conservés, tandis que les autres résidus non-hydrophobes sont plutôt périphériques.

Sur la base de ces principes simples, il est donc possible de déduire immédiatement, à partir de la seule séquence d'une protéine, sa segmentation en éléments de structure, ainsi que la nature probable de certains d'entre eux.

En pratique, on exploite encore les résultats issus de méthodes « classiques » de recherche rapide dans les banques de séquences (BLAST, FASTA) et les candidats potentiels sont triés

par une comparaison plus approfondie *via* HCA. Cette démarche conduit également à étendre les régions de similitude de part et d'autre de celles initialement détectées par les méthodes automatiques. L'information structurale apportée par HCA permet de valider la faible similitude détectée par BLAST.

En conclusion, HCA est une technique puissante permettant une représentation graphique et bidimensionnelle des protéines donnant une information sur leurs caractéristiques structurales (Eudes et al. 2007).

Cette approche permet donc la comparaison entre des protéines très divergentes les unes des autres ayant moins de 30% d'identité mais également entre protéines ayant subi des insertions ou délétions de larges domaines.

L'exploitation bidimensionnelle HCA des séquences de protéines est certainement l'une des approches les plus sensibles pour détecter, à partir des seules séquences, des parentés entre protéines ayant très fortement divergé au cours de l'évolution.

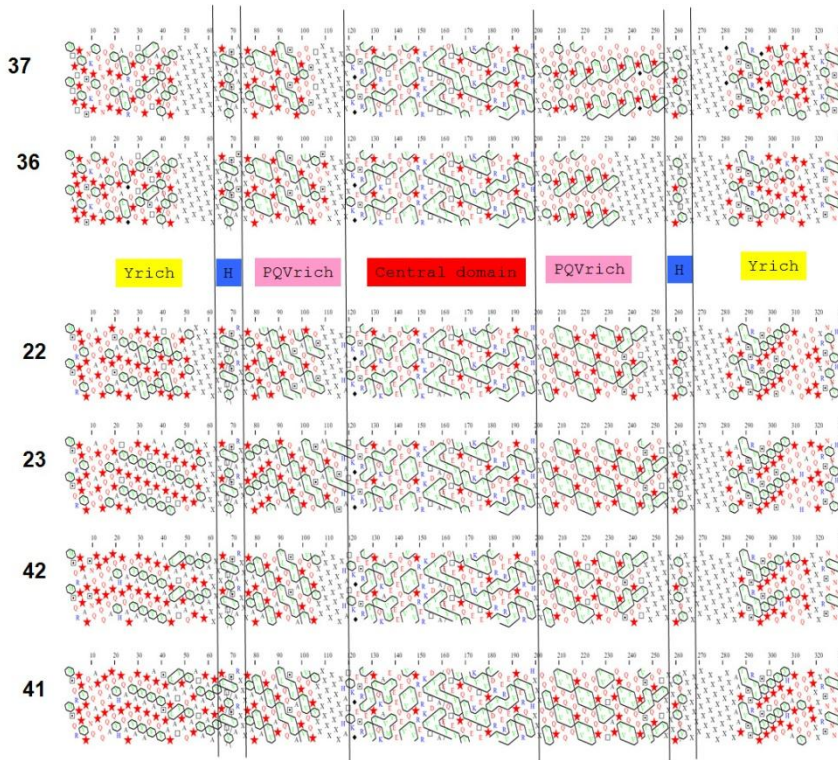
Chaque épiplasmine a été traitée par la méthode HCA pour déterminer ses caractéristiques structurales spécifiques. Ce travail a largement été validé par Philippe Bouchard, mon responsable de thèse, qui est particulièrement formé à cette technique. Au cours de ces mois d'analyse, j'ai pu apprécier la puissance d'HCA et manipuler quelques concepts associés.

Ici nous utilisons HCA pour ses propriétés à définir les domaines constituant les protéines.

L'alignement des séquences des épiplasmies par la méthode HCA nous a permis de montrer que ces protéines étaient modulaires.

Les 51 séquences possèdent toutes un domaine central de 80 résidus. L'analyse des parties N- et C-terminales met en évidence différents domaines structuraux dans chaque épiplasmine. La comparaison de l'organisation de ces domaines permet de rassembler les épiplasmies en 5 groupes qui sont représentés dans les figures 25 à 29.

Sous-groupe 1a



Sous-groupe 1b

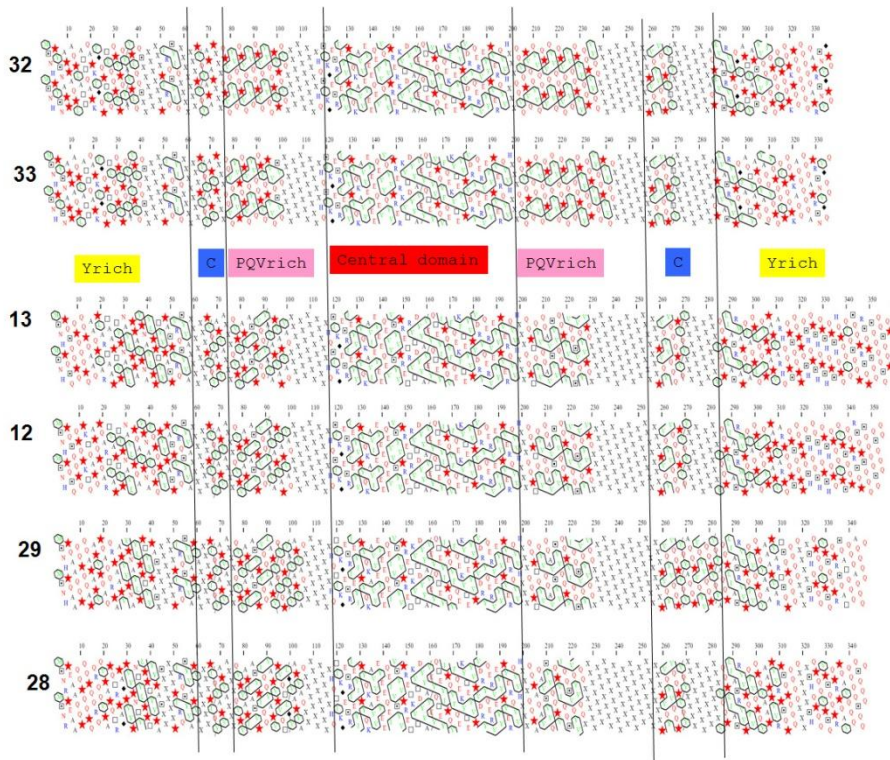
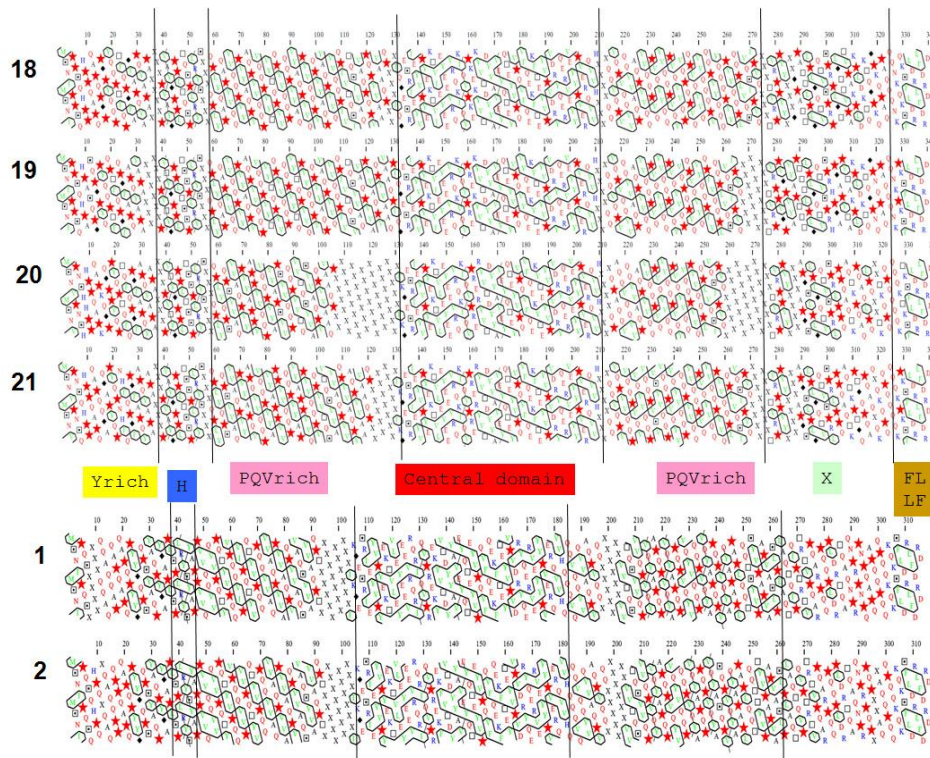


Fig.25 : Représentation en HCA des épiplasmines des sous-groupes 1a et 1b. Dans ces deux sous-groupes, on montre la présence des domaines riches en tyrosine, des domaines charnières et des domaines riches en PVQ de part et d'autre du domaine central.

Sous-groupe 2a



Sous-groupe 2b

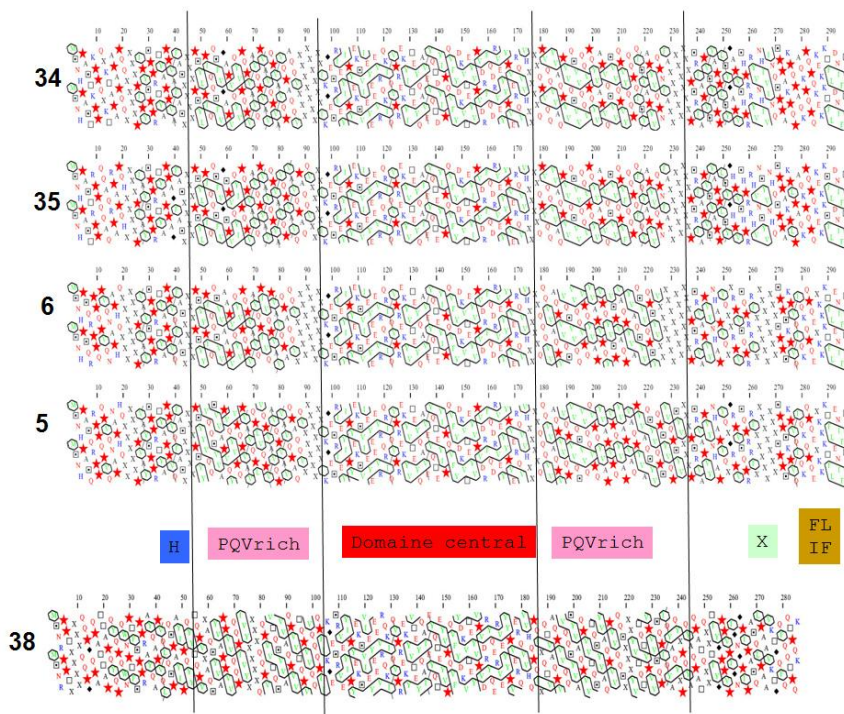
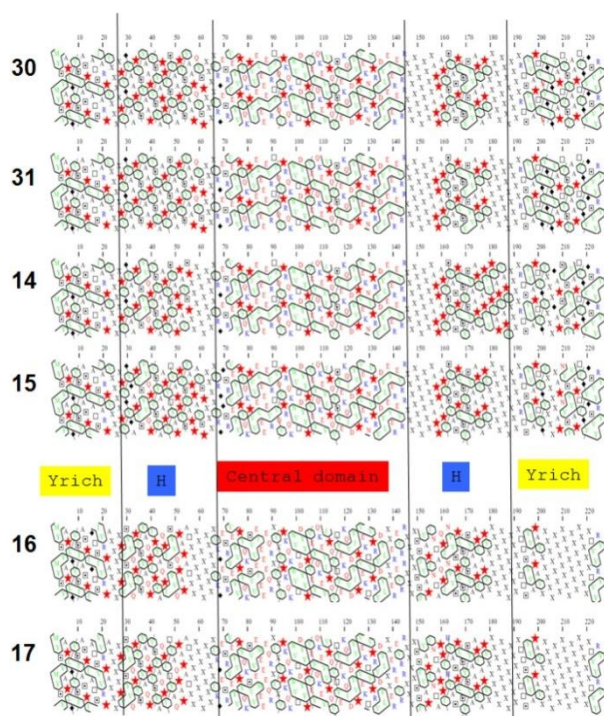


Fig.26 : Représentation en HCA des épiplasmines des sous-groupes 2a et 2b. Dans le sous-groupe 2a, on montre la présence du domaine riche en tyrosine dans la partie N-terminal de la protéine, suivi par une charnière et un domaine riche en PVQ, ensuite on a le domaine central suivi d'un domaine riche en PVQ et apparition d'un domaine hydrophobe et aromatique appelé « FLLF ». Dans le sous-groupe 2b, on trouve la même organisation des domaines que dans le sous-groupe 2a, mais on n'a pas le domaine riche en tyrosine dans les extrémités N-terminales des protéines.

Sous-groupe 3a (A)



Sous-groupe 3b (B)

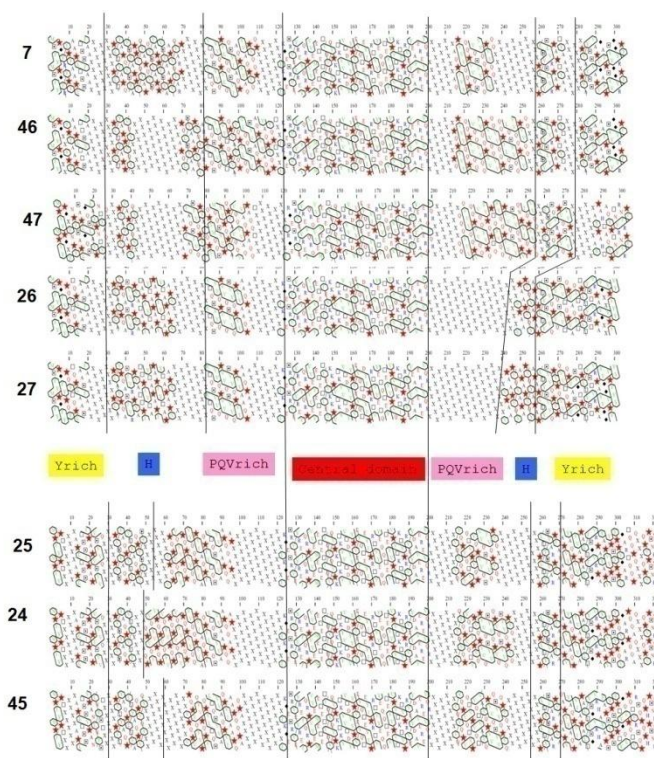
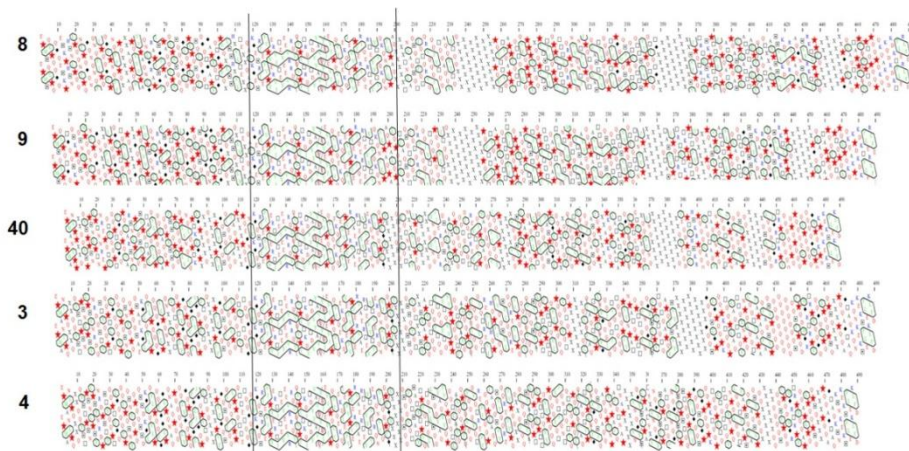


Fig.27 : Représentation en HCA des épiplasmiques du groupe 3. A- Dans le sous-groupe 3a, on trouve juste des domaines riches en tyrosine et des charnières de part et d'autre du domaine central. B- Dans le sous-groupe 3b, on montre présence des domaines riches en tyrosine, des domaines charnières et des domaines riches en PVQ de part et d'autre du domaine central.

Sous-groupe 4b



Sous-groupe 4a

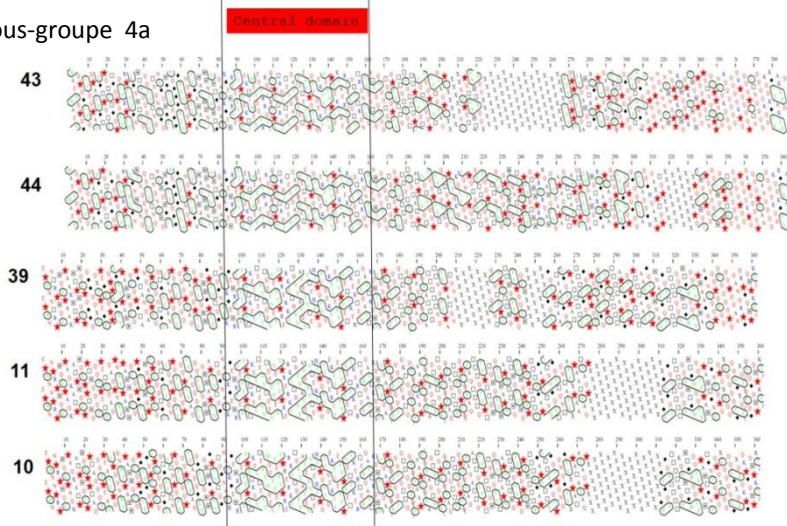
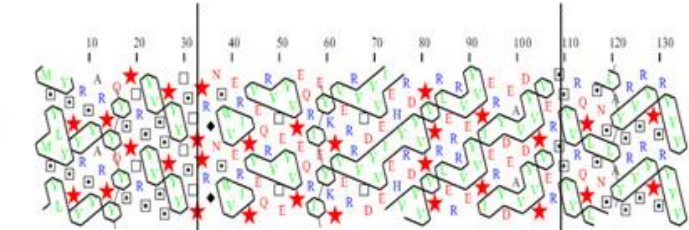


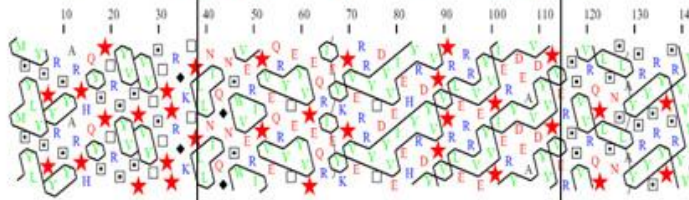
Fig.28: Représentation en HCA des sous-groupes 4a et 4b. Dans ces deux sous-groupes 4a et 4b, on a identifié la présence du domaine central, avec des domaines non-structurés dans les parties N-et C- terminales des protéines.

Sous-groupe 5b

48



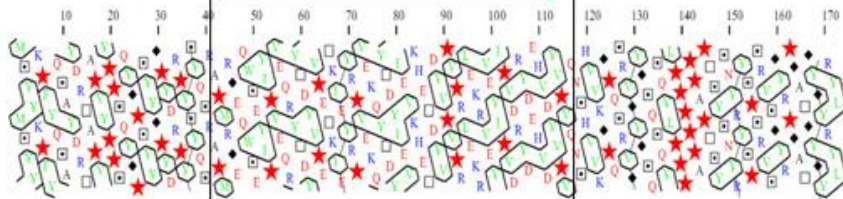
49



Sous-groupe 5a

Central domain

50



51

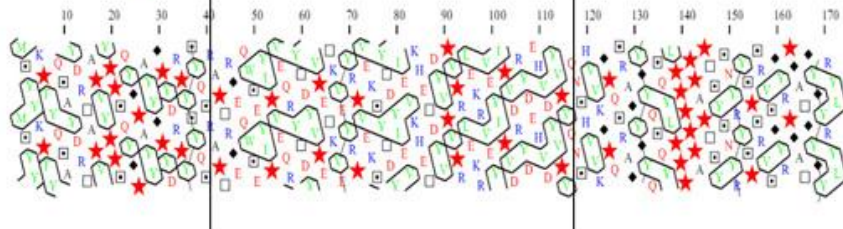


Fig.29 : Représentation en HCA des épiplasmies des sous-groupes 5a et 5b. Dans les deux sous-groupes 5a et 5b, on montre la présence d'un domaine central flanqué par des domaines riches en tyrosine.

Ces figures montrent les représentations schématiques en HCA des différents sous-groupes, sur lesquelles on a délimité les domaines identifiés. Ces domaines ont des longueurs variables et sont :

- a) Un domaine riche en Tyrosine dans les deux parties N- et C- terminales de la protéine
- b) Un domaine charnière
- c) Un domaine riche en acides aminés « Proline, Valine et Glutamine » PVQ
- d) Un domaine central

La charnière est une transition entre le domaine riche en tyrosine et le domaine riche en PVQ, à l'exception du sous-groupe 3a où l'on note une absence de ce domaine PVQ.

Pour les deux sous-groupes 4a et 4b, le domaine central est le seul présent (fig.28).

Pour les sous- groupes 5a et 5b, on a identifié de part et d'autre du domaine central, des domaines riches en tyrosine (fig.29).

Pour faciliter la lecture des résultats obtenus, ces informations sont représentées selon l'analyse des groupements par la méthode GCA pour « Generalized Cluster Analysis » (Fig. 30).

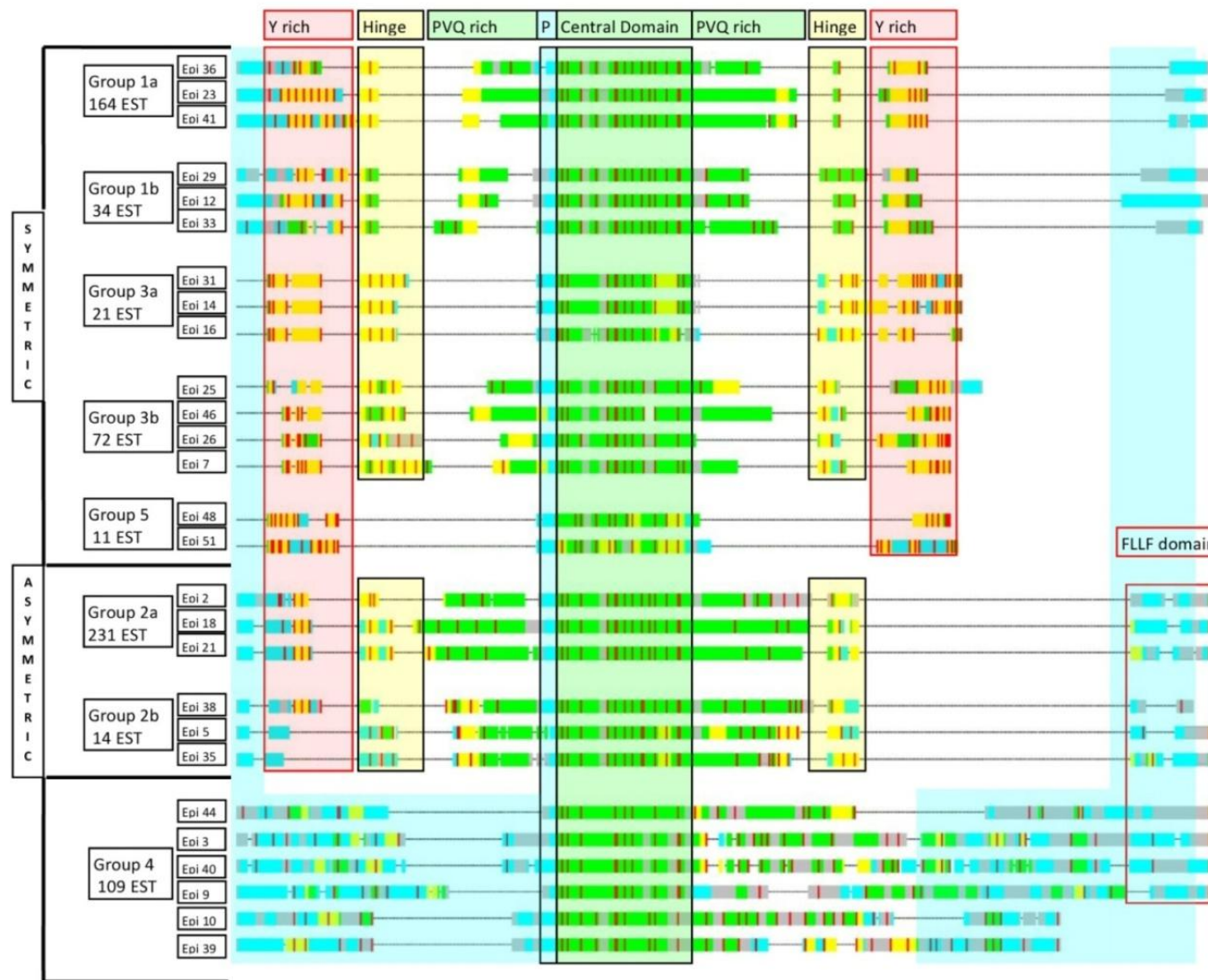


Fig.30 : Organisation modulaire des épiplasmines de *P. tetraurelia* en utilisant la représentation des GCA « Generalized Cluster Analysis ». Pour chaque protéine, les groupes hydrophobes sont représentés en vert, les boucles qui sont des régions formées par des résidus non hydrophobes sont représentés en bleu et les ambivalents qui sont des régions pouvant former aussi bien des groupes hydrophobes que des boucles sont représentés en jaune. Plusieurs domaines structuraux déterminés par HCA sont encadrés en verts pour le domaine central partagé par toutes les épiplasmines, en jaune et rose pour la charnière et le domaine tyrosine respectivement.

La méthode GCA est une extension de la représentation HCA, qui en plus des regroupements des résidus hydrophobes, prend également en compte les regroupements de résidus formant des boucles qui sont des régions formées par des résidus non hydrophobes et ayant la capacité d'interagir avec le solvant. L'étude combinée des deux genres de groupements permet une analyse plus fine des protéines.

Pour simplifier et clarifier la comparaison des différents groupes, une seule des séquences issues de la dernière duplication du génome est représentée dans la figure 30.

La représentation GCA permet donc de distinguer les différents domaines structuraux : les hydrophobes, les boucles et les groupes ambivalents qui sont représentés en vert, bleu et jaune respectivement dans la figure 30 (les groupes ambivalents sont des régions capables de former des domaines structurés aussi bien que des boucles non structurées).

Dans cette figure, la principale caractéristique de ces épiplasmines est leur domaine central très structuré selon son organisation en groupes hydrophobes.

Ce domaine débute par un court motif non structuré contenant un site putatif de phosphorylation composé de sérine/thréonine.

De chaque côté du domaine central, les 2 extrémités N- et C- terminales ont défini bien clairement les différents domaines structuraux pré-cités :

- i) Un domaine structuré contenant des motifs riches en répétitions PVQ.
- ii) une charnière avec une séquence consensus composée de Ph[QSTR]Y[AS] qui forment des feuillets β ou simplement qui sert comme transition entre les deux domaines.
- iii) Un domaine riche en tyrosine.

Les épiplasmines sont définies comme l'assemblage de ces différents modules, et sont groupées ainsi selon les similarités et l'arrangement de ces derniers.

Ainsi, on peut remarquer que ces groupements structuraux obtenus par la méthode HCA sont en accord avec la topologie de l'arbre obtenu suite à la comparaison des séquences alignées.

De même, cela est vrai pour la subdivision de chacun de ces 5 groupes de la famille des épiplasmines en sous-groupes a et b. Donc, il est possible de conclure que la méthode HCA est aussi performante pour détecter les limites de domaines au sein de protéines modulaires que pour détecter, au sein d'une même famille de protéines, des duplications de gènes.

Par cette méthode HCA, nous montrons que la plupart des épiplasmines (41) présentent un arrangement de leurs domaines structuraux (fig.25, fig.26 et Fig.27a et 27b) et peuvent être regroupées en deux classes appelées symétrique et asymétrique. Au contraire, les dix épiplasmines restantes du groupe 4 présentent une transition brusque de chaque côté du domaine central avec 2 régions non structurées aux extrémités N- et C-terminales. Ces protéines constituent une classe appelée Atypique, sans géométrie définie (fig.28 et 30).

Dans **la classe symétrique**, les domaines structuraux sont disposés en miroir de part et d'autre du domaine central. Les protéines symétriques des groupes 1 et 3, ont un ensemble complet de domaines : un domaine riche PVQ suivi par une charnière et terminé par un domaine riche en tyrosine (fig.30). Les protéines de ces groupes peuvent être distinguées par des différences structurales évidentes. Dans le groupe 1, les domaines riches en PVQ et en tyrosine sont séparés par une seule séquence charnière (fig.25 et 30). Dans le groupe 3, le domaine charnière est dupliqué de 5 à 6 fois, il se chevauche parfois et tend à se substituer au domaine riche en PVQ (fig.27a et 27b et 30). De même, les protéines dérivant des sous groupes 1a, 1b, 3a et 3b peuvent être distinguées par des différences structurales spécifiques. Les épiplasmines des sous-groupes 1a et 1b présentent une différence dans leurs régions riches en tyrosine dans les parties N- et C- terminales de la protéine. Dans le sous-groupe 1a, les protéines présentent une harmonique évidente en représentation HCA, due à la présence répétitive des résidus tyrosine tandis que les protéines du sous groupe 1b présentent une répartition désorganisée de ces résidus (fig.31).

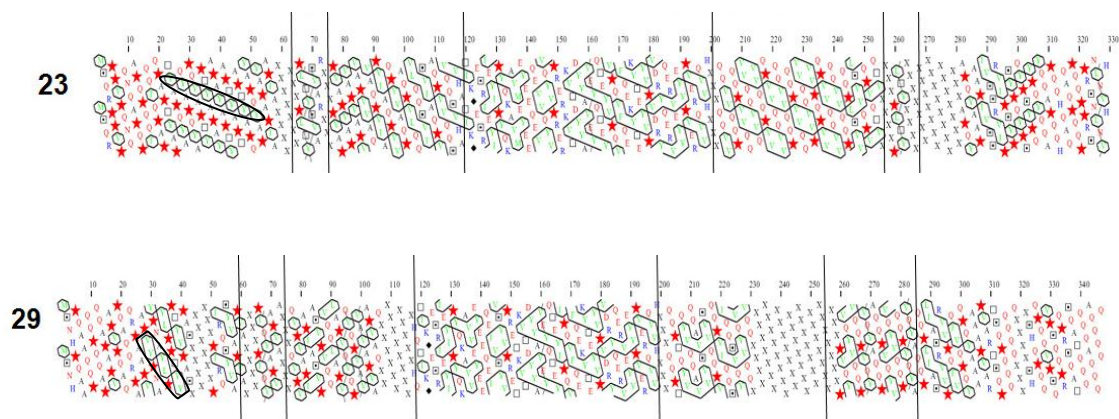


Fig.31 : Comparaison structurale des 2 représentants des sous-groupes 1a et 1b en utilisant la méthode HCA. L'Epi 23 appartenant au sous-groupe 1a présente une harmonie à cause des répétitions organisée des résidus tyrosines (entourée par une ellipse), tandis que l'Epi 29 appartenant au sous-groupe 1b présente une répartition désorganisée des résidus tyrosines (entourée par un rectangle).

Dans le groupe 3, les épiplasmines du sous-groupe 3a diffèrent de celles du sous-groupe 3b par l'absence des régions riches en PVQ sans perte de la symétrie (fig.27a et fig.30).

L'arrangement structural le moins complexe est celui des épiplasmines symétriques du groupe 5, avec seulement un domaine riche en tyrosine de chaque côté du domaine central (fig.29).

La **classe des Atypiques**, constituée exclusivement du groupe 4 ne montre pas d'arrangement modulaire à part le domaine central. (fig.28).

La **classe asymétrique** est représentée par le groupe 2. L'arrangement séquentiel des domaines est conservé à l'extrémité N-terminal des protéines tandis que l'extrémité C-terminal présente un domaine alternatif: le domaine « charnière » qui est suivi par une séquence non structurée suivie d'une séquence très spécifique de résidus hydrophobes et aromatiques appelé « FLLF » (fig.26). Ce domaine « FLLF » pourrait avoir des caractéristiques spécifiques dont nous reparlerons dans la deuxième partie des résultats. Dans ce groupe de protéines, on peut distinguer les sous-groupes 2a et 2b en se basant sur la différence des régions riches en tyrosine. Les protéines du sous-groupe 2a présentent une distribution harmonique des résidus tyrosines. Le domaine « FLLF » n'est pas exclusif aux épiplasmines asymétriques car on le trouve dans certaines protéines du groupe 4 (Epi 3, 4, 8, 9, 40, 43, 44) qui n'ont pas de géométrie définie.

II.3. Recherche des protéines contenant des domaines apparentés aux épiplasmines

Dans le but de compléter l'analyse de ces épiplasmines, une analyse affinée des groupements hydrophobes du domaine central, partagé par toutes ces protéines a été réalisée. Elle montre que ce domaine est constitué de sept répétitions d'un motif consensus [ERK]XX[VILT]EY[VIY] (fig. 32A).

Ce motif peut être observé dans le domaine central des épiplasmines de *Tetrahymena* Epi T1, 2, 3 et 5.

Une recherche spécifique par Blast de ce motif dans le génome de la paramécie suivie d'une analyse par la méthode HCA a révélé la présence d'une paire de protéines paralogues Para 21655 et Para 23342. Ces deux protéines présentent un module constitué des 4 premières répétitions du domaine central des épiplasmines.

La même recherche dans le génome de *Tetrahymena thermophila* a révélé la présence d'une protéine nommée Tetra 2829 possédant le même module structural (fig.32).

Ces nouvelles protéines identifiées chez *P. tetraurelia* et *T. thermophila* sont divergentes par rapport aux membres de la famille des épiplasmines. On notera toutefois qu'elles gardent une richesse en résidus P et Q dans leurs partie N- et C- terminales (fig.33).

Alignement des sept motifs répétés dans les domaines centraux des épiplasmines de *P.tetraurelia* et *T.thermophila*

						Q																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											</
--	--	--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

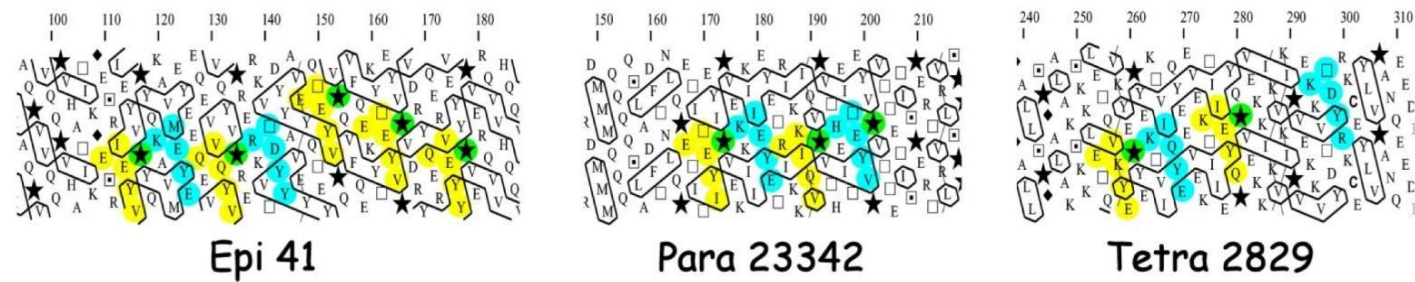


Fig.32 : Organisation Modulaire du domaine central des épiplasmines. A- Deux paralogues chez *P.tetraurelia* et un orthologue chez *T.thermophila* partagent la moitié du domaine central des épiplasmines. B- Représentation par HCA de ces motifs.

Tetra 2829

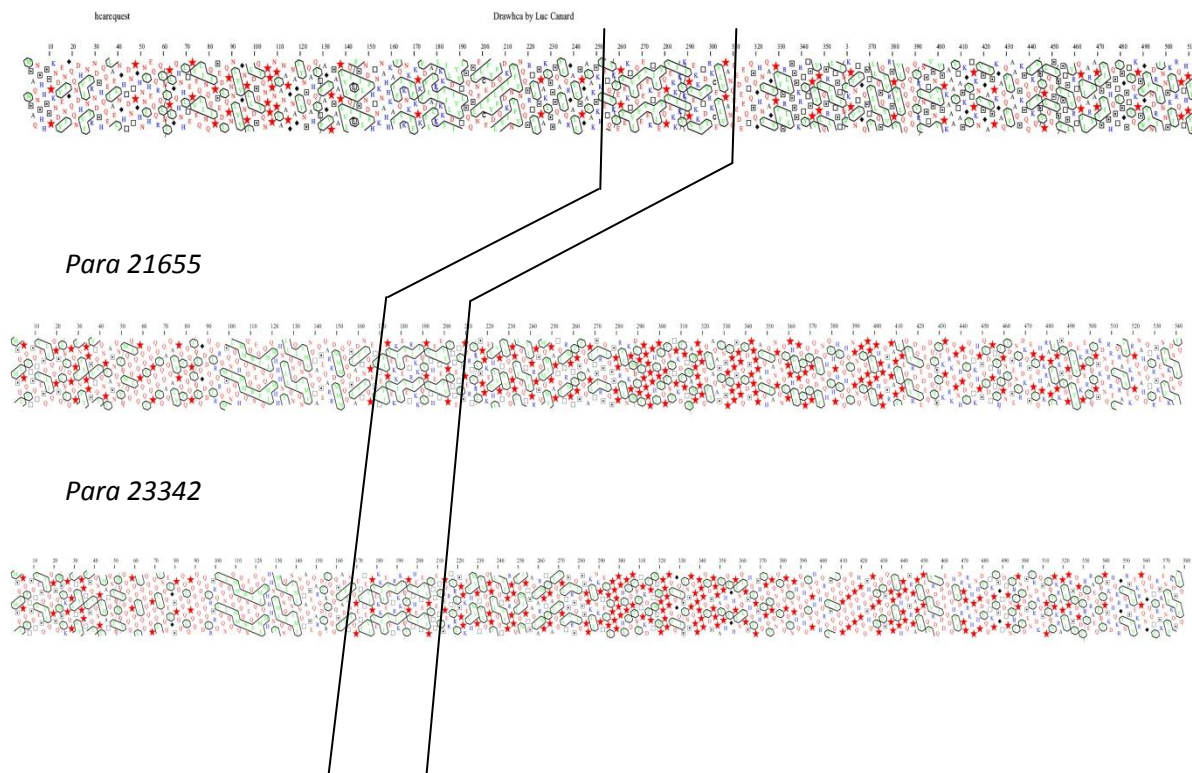


Fig.33: Représentation en HCA des Tetra 2829, Para 21655 et de Para 23342. Pour les séquences Para 21655 et Para 23342, on trouve que la partie N-terminale est une région riche en P et Q ; Concernant Tetra 2829, on trouve des régions riches en P et Q et on voit une similarité entre son domaine central et ceux des séquences Para (le demi domaine central commun est délimité par des traits).

II.4. Comparaison des épiplasmines de la paramécie avec leurs orthologues chez *Tetrahymena*

La méthode HCA a été appliquée à l'ensemble des épiplasmines de *Tetrahymena* afin de préciser leurs caractéristiques modulaires. Puis de les comparer aux épiplasmines de la paramécie.

Dans les études suivantes représentées sur la figure 34, la distribution des résidus hydrophobes est marquée en jaune. Des couleurs spécifiques sont utilisées pour marquer les résidus non hydrophobes qui sont conservés à l'intérieur de la séquence.

Epi T5, la plus petite protéine trouvée chez *Tetrahymena*, est de structure comparable avec Epi 51, la petite épiplasmine du groupe 5. En effet ; la distribution globale des groupements hydrophobes et des positions topologiques montre que ces 2 protéines partagent une structure similaire.

Pour l'**Epi T4**, nous n'avons pas trouvé des structures comparables chez la paramécie.

Pour **Epi T3**, les groupements hydrophobes compacts ayant un contenu élevé en résidus aromatiques sont observés dans la partie C-terminal du domaine central, comme dans le groupe 3 des épiplasmines de paramécie. Malgré l'hétérogénéité du groupe 3, cette analyse de l'Epi T3 indique que cette protéine est apparentée structuralement au groupe 3 des épiplasmines.

L'affiliation de l'**Epi T2** au groupe 2 des épiplasmines est plus évidente. Le domaine typique alternatif observé dans les épiplasmines asymétriques est présent dans l'Epi T2 avec le domaine terminal FLLF.

De même, l'**Epi T1** est apparentée au groupe 1 des épiplasmines de paramécie. Les deux types de séquences portent deux domaines riches en PVQ flanqués par un domaine central conservé. Dans l'Epi T1, il n'y a pas de domaine FLLF, comme observé précédemment pour les épiplasmines symétriques du groupe 1.

La comparaison des épiplasmines de la paramécie avec leurs orthologues de *Tetrahymena* montre la relation entre les groupes 1, 2, 3, et 5 et les Epi T1, 2, 3 et 5 respectivement.

Cette démonstration que les épiplasmies identifiées chez *Tetrahymena* soient apparentées structuralement aux épiplasmies de la paramécie, suggère l'existence d'un ancêtre commun pour l'épiplasme de *Paramecium* et *Tetrahymena*.

Aury et al. ont proposé une séparation entre *Tetrahymena* et *Paramecium* immédiatement après la « old duplication » (Aury 2006), ce qui veut dire que l'ancêtre commun aurait présenté au minimum 4 copies de chacun des 5 types différents d'épiplasmies (groupes 1 à 5). Ceci est bien visible sur l'arbre Figure 24, juste après les cercles bleus.

Si c'est le cas, on peut supposer que *Tetrahymena* a éliminé 3 copies de chaque groupe pour ne garder qu'un représentant des groupes 1, 2, 3 et 5. Dans le cas du groupe 4, c'est les 4 copies qui auraient été perdues.

Le maintien de la plupart des gènes dupliqués est une spécificité de l'histoire évolutive de *Paramecium*. Si l'on compare d'un point de vue morphologique l'épiplasme de *Tetrahymena* et *Paramecium* la différence la plus évidente réside dans la présence d'une segmentation de l'épiplasme. Le cortex de *Tetrahymena* est un territoire ouvert, continu et organisé en bandes antéro-postérieures sans segmentation ni unité corticale comme *Paramecium*. Les épiplasmies du groupe 4 de la paramécie pourraient être reliées au besoin de spécifier et de réguler cette segmentation de l'épiplasme.

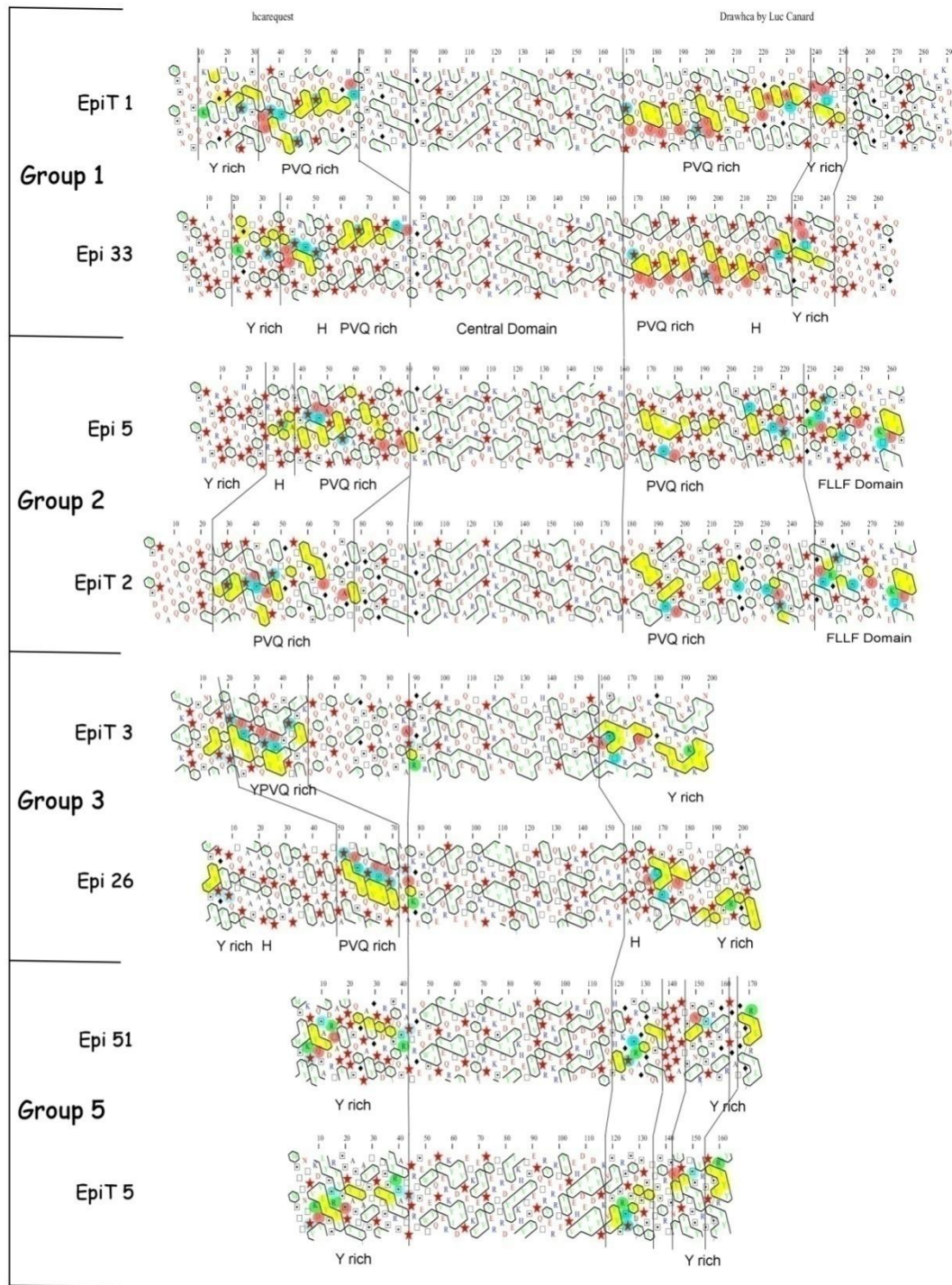


Fig.34 : Evidence de la présence des domaines structuraux communs entre les épiplasmies de *P.tetraurelia* et leurs orthologues (Epi T) chez *T.thermophila*. Représentation en HCA où les résidus hydrophobes sont marqués en jaune, les casseurs des hélices P, G, T, S en bleu. Les résidus alcalins sont marqués en vert ; A et Q en rose.

II.5. La famille multigénique des épiplasmines et le niveau d'expression de ses membres. Détection d'éléments promoteurs putatifs :

Le génome des Eucaryotes pluricellulaires ne contient qu'une proportion faible de séquences dites "codantes": séquences d'ADN transcrites en ARN messagers, eux-mêmes traduits en protéines. Il existe une différence d'expression des gènes selon les tissus et dans le temps (différence d'expression spatio-temporelle). Le taux d'expression des gènes, c'est-à-dire la quantité d'un ARN messager produit, est très variable. Le séquençage d'ADN complémentaire ou ADNc permet de caractériser l'ensemble des ARN messagers exprimés dans la cellule. Dans le cas des eucaryotes unicellulaires, il n'existe pas de tissu, une seule cellule doit assumer toutes les fonctions dévolues à des tissus différenciés. L'unicellulaire, avec de nombreux territoires différenciés a autant besoin d'une régulation spatio-temporelle de l'expression de ses gènes qu'un organisme pluricellulaire. A noter que dans le cas particulier des ciliés, les génomes macronucléaires sont compacts et ont une forte proportion de séquences codantes.

L'étude globale de l'expression des gènes ou « transcriptomique » permet de déterminer la « signature » d'une cellule ou d'un groupe de cellules dans un état physiologique ou pathologique donné, à un moment donné. L'analyse quantitative de l'expression des gènes peut être réalisée par RT-PCR, par PCR quantitative ou par la compilation des nombres d'EST.

Pour étudier le niveau d'expression de chaque membre de la famille multigénique des épiplasmines, nous avons utilisé les nombres d'ESTs des épiplasmines compilés puisque ces données étaient disponibles sur Paramecium DB.

Les EST(s) ou Expressed Sequence Tag sont des courtes séquences de 300 à 500 nucléotides résultant du séquençage partiel de chacun des clones d'une banque d'ADNc. Ces séquences permettent de dresser un inventaire des gènes transcrits.

Chez la paramécie, une compilation du nombre des ESTs pour chacune des 51 épiplasmines a été exécutée à partir de (http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/download/fasta/protein_info.txt), donnant une estimation de leurs niveaux d'expression (dans la gamme entre 0 et 72 EST).

En positionnant la répartition de ces 656 ESTs sur l'arbre de similarité précédemment obtenu, on obtient une distribution très inégale entre les groupes et les sous-groupes : plus des 71% des ESTs concernent seulement les 3 sous-groupes: 1a, 2a, 3b (fig.24).

Cette répartition inégale des ESTs entre les sous-groupes a et b, avec une plus forte expression des sous-groupes a, montre qu'il pourrait exister une régulation de l'expression des gènes chez la paramécie.

Suite au séquençage du génome, les régions 5'UTR, contenant en général les éléments régulateurs, sont disponibles pour toutes les épiplasmines. Les régions intergéniques sont relativement courtes et nous possédons une famille multigénique découpée en groupes fonctionnels différents. Tous ces éléments nous ont amené à procéder à un alignement des régions 5'UTR de toutes les épiplasmines et à chercher s'il était possible de mettre en évidence des motifs conservés dont la présence serait corrélée au taux d'expression.

Les régions 5'UTR des gènes d'épiplasmines ont été alignées premièrement selon le nombre de leurs EST(s), puis selon leurs appartenances aux différents groupes (fig.35).

On remarque que toutes les séquences partagent une partie commune riche en AT, placé 5 à 45 pb en amont de l'ATG ayant pour consensus le motif [AT]AAATAAA[AT] qui peut s'apparenter à une TATA-Box. Certaines séquences présentent également un motif, 12 à 20 pb en amont, de consensus CA (1,3) TA (3,4) [AT]TTAT. Cet élément de séquence, appelé USE pour Upstream Sequence Element, représenté en vert dans les premiers dix lignes des alignements (fig. 35), est présent dans les séquences des sous-groupes 1a, 2a et 3b.

Les dix séquences possédant cet élément « USE » représentent 55 % des ESTs observés pour la totalité de l'ensemble des épiplasmines. La présence de ce motif USE apparaît reliée à la forte expression des sous-groupes 1a et 2a, il pourrait donc être un élément enhancer.

Cependant, cet élément « USE » peut être trouvé en position 3 à 5 résidus en aval de la séquence TATA-like (marquée en jaune) (fig.35). Comme aucune des séquences correspondantes n'est associée à un nombre élevé d'EST(s), nous proposons l'hypothèse que le mauvais positionnement de ce motif « USE » soit à l'origine de la suppression de son rôle d'enhancer.

Tous les membres du sous-groupe 3a partagent cet élément « USE » placé en aval de la séquence TATA-like, ce qui les amène à se comporter comme un sous-groupe ayant un faible

taux d'expression (à l'inverse de ce qui pouvait être attendu). Avec 72 ESTs, on peut supposer que les gènes du sous-groupe 3b représentent le groupe d'expression fort pour contre-balancer la perte, et ce bien que nous n'ayons détecté aucun motif enhancer. Il faut noter que ce sous-groupe 3b présente seulement 2 épiplasmines (Epi 24 et Epi 25) possédant un motif enhancer en bonne position.

Ces données ont été représentées par des triangles de différentes couleurs sur l'arbre de similarité, ainsi les séquences contenant dans leurs régions 5'UTR à la fois des motifs TATA-like et « USE » sont représentées par des triangles rouges, celles qui ont juste le motif TATA-like dans leurs régions 5'UTR sont représentées par des triangles jaunes. Les séquences qui ont motif TATA-like et l'élément « USE » placé en aval de ce dernier motif sont représentées par des triangles bleus sur l'arbre de similarité.

Sur l'arbre de similarité, on distingue bien qu'il y a une répartition différente de ces triangles de différentes couleurs entre les groupes et même entre les sous-groupes, donc on a des niveaux d'expression différents entre les sous-groupes avec toujours une plus forte expression pour le sous-groupe a. Cette situation est vraie pour toute la famille multigénique des épiplasmines sauf pour le sous-groupe 3a qui est moins exprimé que le sous-groupe 3b. On remarque que pour chaque subdivision en sous-groupes, on note une répartition entre deux niveaux d'expression. Cette situation peut être liée à l'histoire évolutive de la famille multigénique des épiplasmines. On peut imaginer qu'après la première duplication du génome aboutissant à la subdivision en sous-groupes, il a pu se produire un événement génétique ayant conduit à la séparation de chaque groupe de la famille en sous-groupes avec des gènes possédant des niveaux d'expression différents.

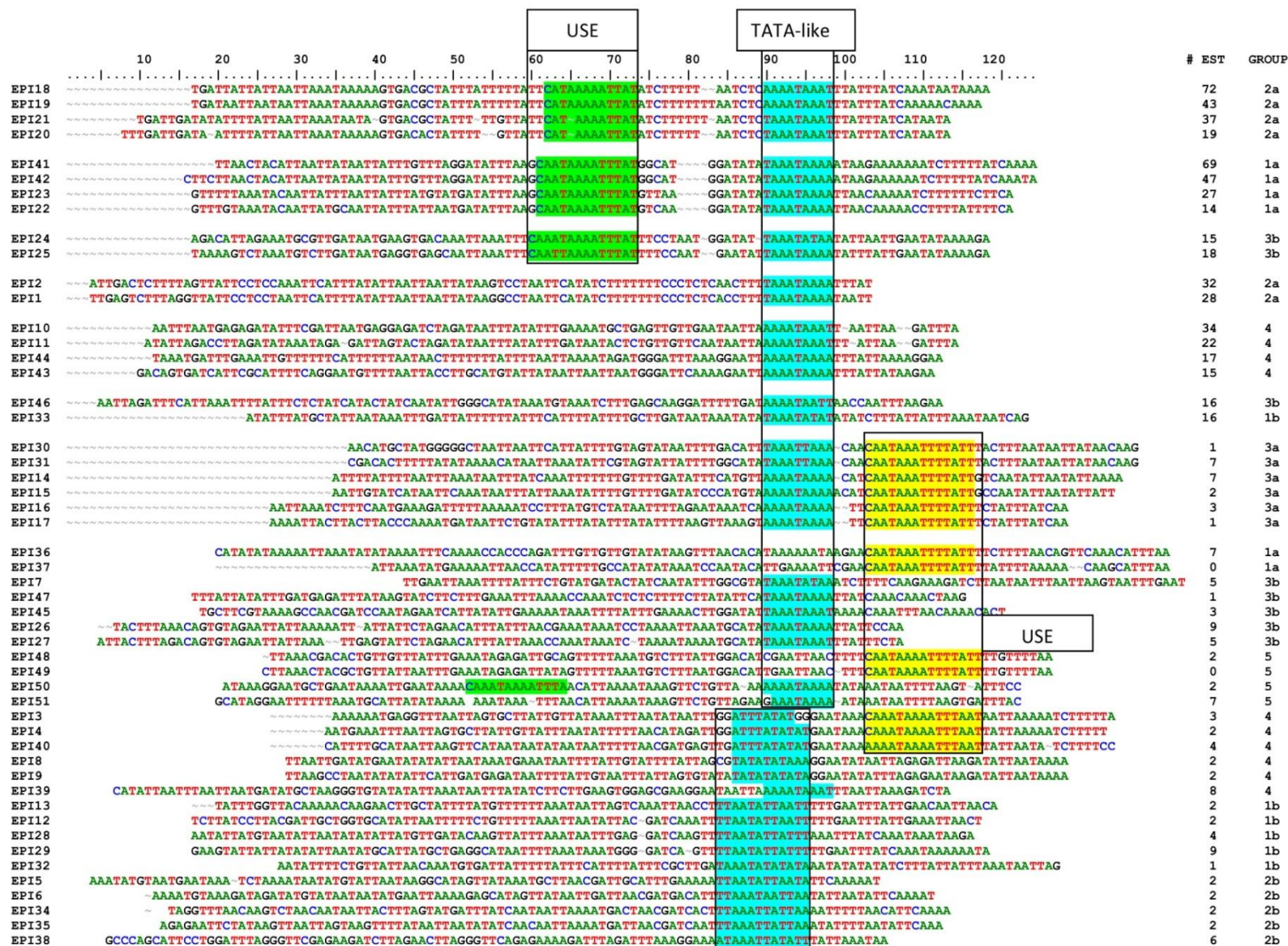


Fig.35 : Analyse des régions 5'UTR des gènes d'épiplasmies de *P.tetraurelia*. Les gènes sont regroupés selon leurs nombres d'ESTs et la présence des éléments suivants : « USE » et « TATA-like ». Ces motifs sont marqués en bleu pour TATA-like et en vert ou jaune pour le motif « USE » selon qu'il est placé en amont ou en aval de l'élément TATA-like respectivement.

III. Conclusion

Les résultats obtenus suite aux co-alignements des séquences et aux analyses structurales des domaines protéiques proposent une classification des 51 épiplasmines en 5 groupes. Ces protéines partagent un domaine central très conservé précédemment décrit par (Pomel et al. 2006), domaine qui forme la signature de cette famille. Malgré la variabilité observée dans les extrémités N- et C- terminaux, il est possible avec la méthode HCA de caractériser un ensemble des domaines structuraux variables constituant ces protéines et facilitant leur classification en assemblages modulaires de domaines structuraux. Ces domaines sont: un domaine riche en PVQ, un domaine riche en Y, une charnière et un domaine contenant le motif FLLF. Les arrangements différentiels de ces domaines aboutissent à une classification similaire à celle obtenue par l'arbre de similarité.

La famille des épiplasmines peut être divisée en trois classes : Symétrique, Asymétrique et Atypique. La classe symétrique comprend 30 protéines avec des domaines structuraux disposés en miroir de chaque côté du domaine central. Cette classe est composée de trois groupes : groupe 1 et 3 et un troisième groupe plus distant des deux premiers qui est le groupe 5. Les quatre épiplasmines du groupe 5 forment la famille des petites épiplasmines, ayant juste un domaine riche en tyrosine de chaque côté du domaine central.

La classe asymétrique formée par le groupe 2 possède 11 membres. Ces protéines retiennent la même organisation structurale des domaines que les protéines symétriques au niveau de leurs régions N- terminales, par contre leurs régions C-terminales présentent le motif FLLF.

La classe Atypique formée par le groupe 4, contient 10 protéines. Elle diffère des deux autres classes par l'absence de modules structuraux communs dans les régions N- et C-terminales mais elle possède un domaine FLLF en commun avec le groupe asymétrique. Ce motif FLLF pourrait être impliqué dans des interactions spécifiques à l'intérieur de la structure épiplasmique.

Selon les nombres des ESTs spécifiques des épiplasmines recherchés dans *Paramecium* DB, presque tous les membres de la famille multigénique des épiplasmines sont exprimés. L'analyse des régions 5'UTR des membres cette famille multigénique montre la présence d'éléments putatifs tels que : TATA box et USE « Upstream Sequence Element » qui peuvent

être mis en relation avec les niveaux d'expression des produits des gènes correspondants. Cela nous permet de proposer que l'association de ces 2 motifs d'expression pourrait constituer une forte région promotrice, à savoir que les dix séquences présentant cette association représentent seulement 1/5 de ces 51 épiplasmines, mais constituent 55% des ESTs trouvées pour cette famille.

Ces données suggèrent que les protéines les plus exprimées (sous-groupes 1a et 2a) pourraient être utilisées d'une manière constitutive tout au long du cycle cellulaire, tandis que les autres protéines seraient exprimées seulement au cours d'une période précise de ce cycle. Le regroupement des séquences, basé sur une structure commune de leur région promotrice soutient l'idée d'une organisation fonctionnelle du génome utilisant des groupes d'expression (régulation de l'expression au cours du cycle).

Il avait été suggéré précédemment par les outils immunologiques qu'il y a des épiplasmines apparentées chez *Paramecium tetraurelia* et *Tetrahymena thermophila*. Nous démontrons par l'analyse structurale que ces deux ciliés partagent un ancêtre commun pour la famille des épiplasmines. Deux événements de duplication du génome ont eu lieu avant la divergence de ces deux espèces. Chez *Tetrahymena*, les copies des gènes d'épiplasmines n'ont pas été conservées tandis que chez *Paramecium*, la plupart des gènes dupliqués ont été conservés.

Cette situation suggère qu'il y ait une néofonctionnalisation possible des gènes comme c'est proposé par la partition de leurs régions 5'UTR et leurs niveaux d'expression.

Cette étude structurale des épiplasmines va nous servir de guide pour analyser la fonction de cette famille multigénique chez *Paramecium* dont nous parlerons dans le deuxième chapitre.

Chapitre II: Analyse fonctionnelle de la famille multigénique des Epiplasmines

Chapitre II: Analyse fonctionnelle de la famille multigénique des Epiplasmines

I. Introduction

La famille multigénique des épiplasmines est formée de 5 groupes de similarité, se divisant chacun en deux sous-groupes possédant des taux d'expression différents. Les épiplasmines sont des protéines modulaires et l'arrangement de ces modules permet de définir 3 types structuraux: symétrique, asymétrique et atypique. L'étendue de cette famille suggère une diversité fonctionnelle des épiplasmines qui pourrait être en relation avec leur appartenance aux différents groupes.

Chez la paramécie, les fonctions de plusieurs familles multigéniques ont été étudiées, il s'agit de celles des centrines (Gogendeau 2007), des actines (Sehring et al. 2007), et de celles des striatines (Thèse Aude Espigat, Septembre 2006). Pour étudier les fonctions de ces différentes familles, deux approches fonctionnelles ont été utilisées, premièrement, l'extinction génique par le mécanisme d'ARN interférence et deuxièmement la localisation des protéines fusionnées à la GFP.

Ces deux approches ont été également utilisées pour une étude préliminaire des épiplasmines par Pomel et al., 2006 , et ont permis de montrer que l'Epi 1 se localise au niveau de l'épiplasme, et que le RNAi de l'Epi 2 a pour conséquence le blocage de la cytokinèse chez la paramécie.

Cette partie des résultats débute par les outils d'analyse fonctionnelle utilisés chez la paramécie. Par la suite, nous présentons l'analyse de cette famille multigénique en utilisant le mécanisme d'ARN interférence, puis nous présentons la localisation des différentes épiplasmines. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une discussion générale où nous avons tenté de mettre en valeur les principales perspectives d'avenir qui se dégagent de ce travail.

II. Analyse détaillée de la famille multigénique des épiplasmines.

II.1. Outils d'analyse fonctionnelle chez la Paramécie

a. Expression de transgènes

Malgré une absence de transformation stable du génome, la paramécie peut exprimer transitoirement tout gène mis sous contrôle de séquences régulatrices endogènes. Pour cela, un plasmide contenant la séquence d'intérêt est injecté dans le macronoyau de la paramécie.

Pour éviter que le plasmide ne soit détruit par la cellule, il est linéarisé et des séquences télomériques de *Tetrahymena* ajoutées aux 2 extrémités vont le stabiliser de telle façon que cet ADN soit pris en charge par la cellule comme n'importe quel autre chromosome (haynes et al. 1995). La transformation macronucléaire peut servir à la fois à compléter des mutants et à exprimer des gènes fusionnés à la GFP. C'est cette technique que nous utiliserons pour localiser les épiplasmines.

Le transgène ainsi obtenu est maintenu et exprimé par la cellule jusqu'à l'autogamie suivante qui se produit une à plusieurs semaines après injection, et qui va permettre la génération d'un nouveau macronoyau à partir du micronoyau.

b. Obtention de mutants macronucléaires

Il peut arriver que la délétion d'un gène devienne héréditaire. Lors de l'injection, lorsque l'inactivation génique a lieu au cours de l'autogamie, il peut se produire une délétion du gène éteint dans le macronoyau néoformé (Garnier et al. 2004). La mutation se transmet ensuite par hérédité maternelle, également appelée macronucléaire, aux générations cellulaires suivantes.

c. Génétique inverse

La génétique inverse définit les techniques qui permettent, à partir d'un gène ou fragment d'ADN, l'étude des fonctions de ce gène et de ses produits, par opposition à la génétique classique dont le but est de localiser le gène responsable de l'altération d'une fonction ou d'un caractère connu en effectuant des croisements entre souches différentes. L'analyse fonctionnelle de l'effet de la délétion des gènes codants pour les protéines d'intérêt peut être

réalisée chez la paramécie par ARN interférence. L'extinction génique peut être obtenue de deux façons distinctes : soit par injection dans le macronoyau d'un transgène dépourvu de séquences régulatrices (Ruiz et al. 1998), soit en nourrissant les paramécies avec des bactéries productrices d'ARN double brin correspondants à la séquence à inactiver (Ruiz et al. 1998; Galvani and Sperling 2002). La technique par microinjection a été couramment utilisée pour l'étude de la fonction d'un grand nombre de gènes chez la paramécie (Ruiz et al. 1999; Deloubresse et al. 1991; Beisson et al. 2001). Le phénomène d'extinction génique dépendant de l'homologie de séquence (interférence ARN) a été confirmée par les travaux de Garnier et al. (2004) mettant en évidence, dans la cellule végétative, d'ARN de 22 à 23 pb homologues au gène ciblé suite à l'injection d'une forte quantité de transgène dans le macronoyau. Ces auteurs ont également confirmé que la séquence régulatrice 3' non-codante a un effet inhibiteur sur l'induction du mécanisme. L'injection des dsRNA dans le macronoyau provoque également une interférence génétique qui est transitoire et disparaît 48h après injection (Galvani and Sperling 2002). Cet effet transitoire pourrait être dû à la dilution des molécules de dsRNA injectées au cours des divisions.

La paramécie étant un protiste cilié bactériophage cultivé en présence de *Klebsiella pneumoniae*, la méthode de feeding préalablement établie et optimisée chez le nématode *C. elegans* a pu être adaptée à cet organisme (Galvani and Sperling 2002). Cette méthode a été mise au point au moyen du vecteur L4440 présentant un double promoteur T7 en orientation inversée, responsable de la formation des dsRNA (Timmons and Fire 1998), ainsi que de la souche d'*E.coli* HT115 (DE3) présentant un gène de T7 polymérase inducible par l'IPTG et une mutation dans le gène de la RNase III de façon à empêcher la dégradation des dsRNA (Timmons et al. 2001). Suite à l'ingestion de bactéries HT115 (DE3) produisant des dsRNA, les phénotypes obtenus sont identiques à ceux générés par microinjection. L'introduction d'un plasmide produisant un ARN simple brin sens ou antisens dans les bactéries HT115 (DE3) ne produit aucun phénotype montrant ainsi que les dsRNA sont les molécules inductrices du mécanisme d'ARN interférence. La fonction de nombreux gènes a été étudiée par cette méthode. C'est le cas de plusieurs gènes impliqués dans la sécrétion des trichocystes (TMP4a, ND7, NSF), des gènes de centrines ou d'actine. La technique de feeding présente de nombreux avantages par rapport à la microinjection. Cette approche est beaucoup plus simple à mettre en œuvre dans la mesure où elle ne nécessite pas l'intervention d'un microinjecteur. Par ailleurs, les souches bactériennes contenant la séquence d'un gène d'intérêt peuvent être congelées à -80°C et ainsi constituer un stock de constructions réutilisables à volonté. La technique de feeding permet après avoir induit un phénotype, d'analyser sa réversion en

continuant de cultiver les cellules dans un milieu ne contenant plus de bactéries HT115 transformées. De plus, il ne semble pas nécessaire d'utiliser de longs dsRNA recouvrant la totalité de la séquence codante pour obtenir une extinction génique par feeding, contrairement à la microinjection (Dupuis-Williams et al. 2002). Enfin, suite à l'ingestion des bactéries produisant des dsRNA, l'induction du phénotype a une plus grande durabilité que l'extinction génique obtenue par microinjection ce qui permet de s'affranchir des problèmes d'extinctions géniques transitoires observés dans certains cas de microinjections. Actuellement, la technique de feeding est utilisée en routine comme outil d'analyse des séquences annotées dans le génome macronucléaire de la paramécie. C'est cette technique que nous avons utilisé pour induire le RNAi des gènes codant pour les épiplasmines étudiées dans ce travail.

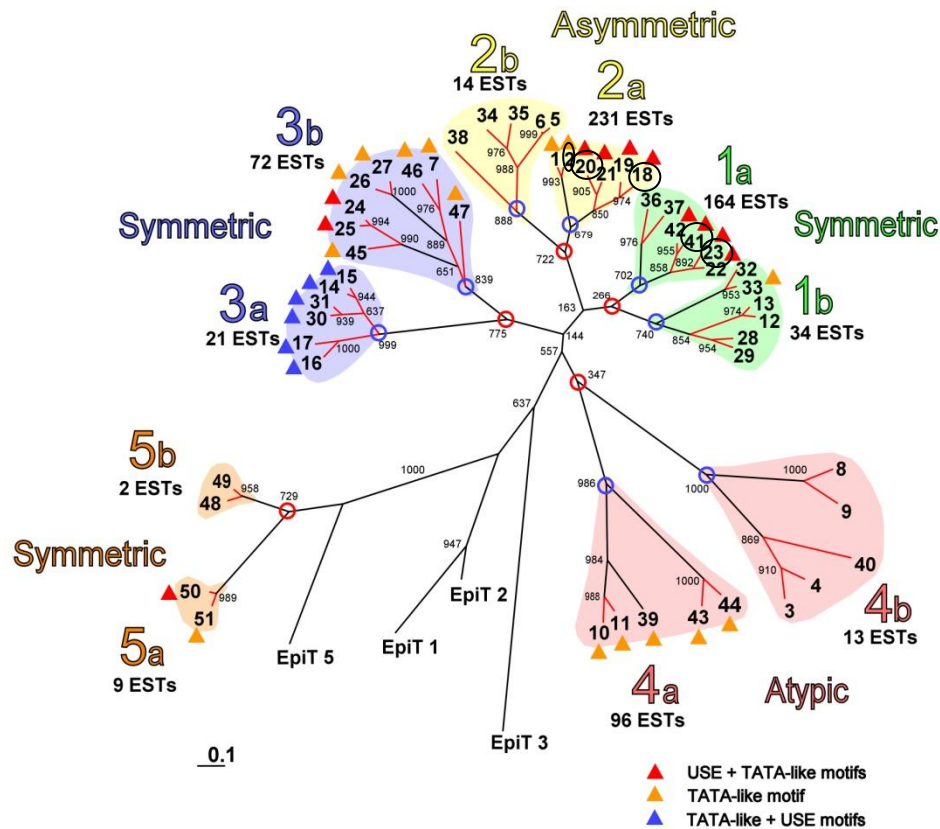
II.2. RNAi des représentants des Epiplasmines

Notre stratégie a été de commencer par étudier les épiplasmines les plus exprimées des trois classes d'épiplasmines, pour ensuite compléter l'analyse en étudiant d'autres représentants de ces classes.

Les deux sous-groupes les plus exprimés sont les deux sous-groupes 1a et 2a.

Dans le sous-groupe 1a qui est composé d'épiplasmines symétriques et totalisant un ensemble de 164 ESTs, nous avons choisi comme candidats l'Epi 23 et L'Epi 41 ayant 25 et 60 ESTs respectivement.

Dans le sous-groupe 2a composé d'épiplasmines asymétriques et représentant 231 ESTs, nous avons choisi comme protéines représentatives l'Epi 2, l'Epi 18 et l'Epi 20 ayant 32, 63 et 19 ESTs respectivement. Les épiplasmines choisies sont entourées sur le cladogramme ci-dessous.



Cladogramme 1 des épiplasmies. Les épiplasmies les plus exprimées sont entourées par des cercles noirs.

Les paramécies ont été nourries par des bactéries HT115 transformées par des vecteurs exprimant la totalité de séquences des épiplasmies correspondantes.

Les effets de RNAi ont été suivis *in vivo* dans le temps par photomicroscopie. Les cellules ont également été examinées en microscopie à fluorescence après immunomarquage avec l'anticorps monoclonal CTS32, reconnaissant un ensemble de polypeptides dont les caractéristiques biochimiques correspondent à l'épiplasmie. Cet anticorps permet de visualiser facilement l'ensemble de l'écaille épiplasmique (Nahon et al. 1993). L'épitope reconnu par l'anticorps CTS 32 demeure inconnu et reste un challenge intéressant.

II.2.1. Effets du RNAi des épiplasmiques symétriques

a. Effet à l'échelle globale de la cellule

L'inhibition de l'expression de l'Epi 23, épiplasmine symétrique appartenant au sous-groupe 1a, induit les phénotypes suivants.

Au bout de 20 heures, le RNAi déclenche une altération de la forme cellulaire. Les cellules s'arrondissent sauf au pôle antérieur, formant des cellules en forme de poires (Fig.36A).

Au bout de 24 heures, on observe l'apparition d'une cellule incapable de terminer sa cytokinèse. Il y a duplication des vacuoles pulsatiles et de la région orale, suivie d'un allongement dissymétrique de la cellule aboutissant à deux territoires cellulaires formant entre eux un angle voisin de 45° donnant la forme Boomerang (fig.36B). Cette cellule nage d'une façon circulaire en tournant sur elle-même.

La cytokinèse est la dernière étape de la mitose. La cellule se scinde en son milieu, afin de former deux cellules filles contenant un stock chromosomique égal. Nous voyons que le phénotype « Boomerang » est un blocage de cette scission. Ce phénotype pourrait être corrélé à une perturbation de la cytokinèse.

Lorsque le feeding est prolongé pendant 24 à 48 heures, les territoires cellulaires n'arrivant pas à se séparer suite à plusieurs tentatives de cytokinèse, il se forme une masse dans laquelle les organelles se sont multipliés et ont gardé leur fonctionnalité. La figure 36C montre une telle masse avec 32 vacuoles pulsatiles et 16 bouches qui semblent fonctionnelles. Nous dénommons cet amas plasmode dans lequel chaque noyau et le cytoplasme qui l'entoure constituent une énergide (Sachs, 1892). L'observation de stades ultérieurs devient problématique, dû à la fragilité des plasmodes vis-à-vis des flux laminaires (pipetages, montage entre lame et lamelle) qui provoquent invariablement leur destruction.

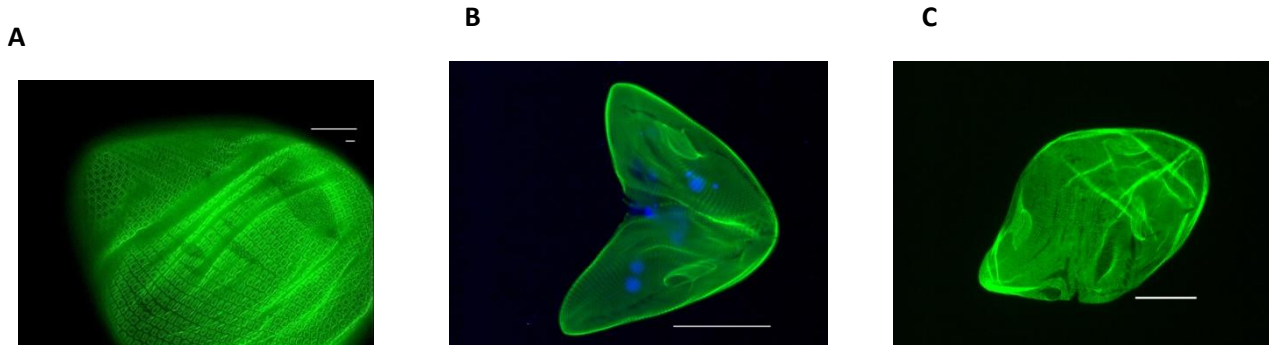


Fig. 36 : Effets du RNAi des épiplasmines symétriques sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32. Le RNAi de l'épiplasmine 23 qui est symétrique et appartenant au sous-groupe 1a, provoque des perturbations au niveau de la cellule, commençant par une forme de poires (A), ensuite il y a blocage de la cytokinèse aboutissant à la forme « Boomerang » (B), suivi par l'apparition des formes plasmodes (C). Barres : A= 1 μ m et 5 μ m ; B= 50 μ m ; C= 50 μ m

Lors de l'inhibition du gène Epi 41, après 48h on observe une hétérogénéité de formes cellulaires : certaines cellules ont la forme de poires (fig.37A), d'autres adoptent la forme Boomerang précédemment décrite (fig.37B), d'autres amas présentent une conformation en chainettes de trois à quatre masses cytoplasmiques toujours reliées entre elles (fig.37C). Après 48 à 60 heures, on observe des plasmodes qui n'individualisent plus leurs énérgides (fig.37D).

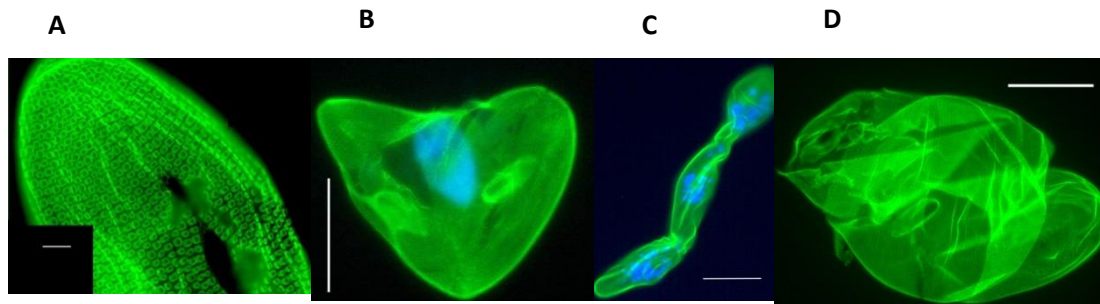


Fig.37 : Effets du RNAi des épiplasmiques symétriques sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32. Le RNAi de l'épiplasmine 41 qui est symétrique et appartenant au sous-groupe 1a, provoque des perturbations au niveau de la cellule, certaines cellules ont une forme de poires (A), d'autres ont la forme « Boomerang » (B), suivi par l'apparition des formes plasmodes (D). Certaines cellules restent attachées les unes aux autres formant des chainettes de 3 cellules (C). Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI. Barres : A= 5 μ m ; B= 50 μ m ; C= 50 μ m ; D= 50 μ m.

En conclusion, le RNAi des 2 épiplasmiques symétriques (Epi 23 et Epi 41) n'affecte pas la viabilité des cellules, car les mouvements ciliaires ne semblent pas être altérés et les cellules sont capables de se nourrir.

La nage des paramécies ne semble pas altérée, sauf dans le cas où la géométrie de la cellule est modifiée, c'est-à-dire dans le cas de phénotype « Boomerang ». Les vacuoles pulsatiles et la bouche se dupliquent et gardent apparemment leurs fonctions.

Ces expériences de RNAi mettent en évidence une indépendance des cycles de duplication d'organelles, telles que les vacuoles pulsatiles et la bouche, vis-à-vis des cycles de cytokinèse. Dans le cas des épiplasmiques symétriques, l'outil RNAi semble n'affecter qu'une partie tardive des événements morphogénétiques dont l'enchaînement définit la division cellulaire.

b. Effet du RNAi sur l'organisation corticale : effet locaux

Nous avons décrit à l'échelle globale de la cellule, les phénotypes obtenus par le mécanisme d'ARN interférence des 2 épiplasmies symétriques « Epi 23 et Epi 41 ». L'étude de la perturbation au niveau du cortex a été réalisée par immunofluorescence en utilisant l'anticorps monoclonal CTS32 décrit plus haut.

L'inhibition du gène Epi 23, provoque l'apparition du phénotype Boomerang, accompagné d'une perturbation de l'organisation du matériel épiplasmique. Comparé à une paramécie sauvage (fig.38A), on note une accumulation d'agrégats entre les écailles épiplasmiques (fig.38B) Cette accumulation d'agrégats est accompagnée d'un changement de la forme de certaines écailles (fig.38C).

L'inhibition du gène Epi 41 provoque les mêmes effets que dans le cas de l'Epi 23 ; on note également une accumulation d'agrégats entre les écailles (fig.38D).

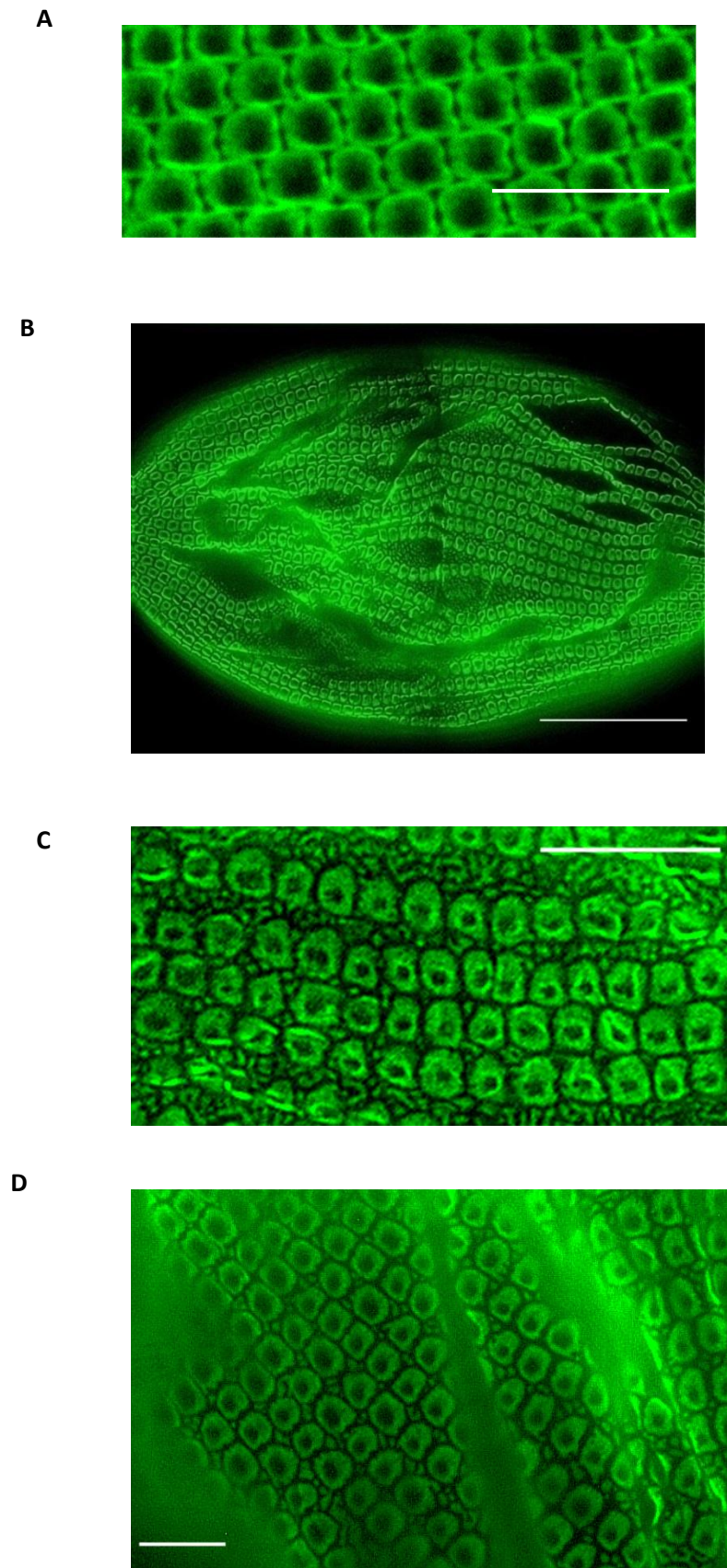
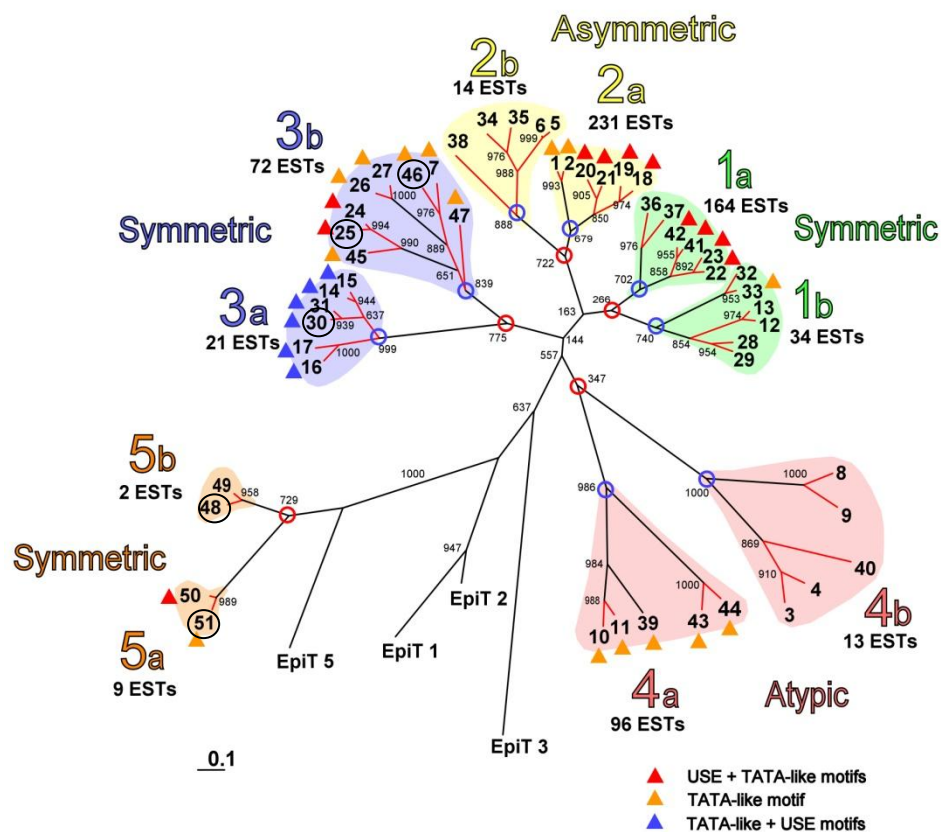


Fig.38 : Altérations au niveau local observées avec le RNAi de l'Epi23 et de l'Epi 41. Suite au RNAi de l'Epi 23 (B et C) et l'Epi 41 (D) qui sont deux épiplasmiques du sous-groupe 1a, l'immunomarquage avec l'anticorps monoclonal « CTS32 » montre du matériel entre les cinéties qu'on ne voit pas dans les écailles normales des cellules sauvages (A). Barres : A= 5 μ m ; B= 50 μ m ; C= 50 μ m ; D= 50 μ m.

Si manifestement du matériel épiplasmique apparaît entre les unités corticales, ces observations ne permettent pas de décider si ce matériel vient du délitement de l'écaille ou bien si d'autres épiplasmines néosynthétisées n'ont pas pu s'intégrer à l'intérieur des écailles (Fig.38). Dans le premier cas, c'est une fonction de la solidité structurale de l'écaille, ainsi, l'absence d'apport des Epi 23/41 perturbe la stœchiométrie des épiplasmines dans l'écaille, la rendant plus fragile. Dans le deuxième cas, on peut imaginer que c'est une fonction d'accueil des épiplasmines dans l'écaille ; une écaille de moins en moins riche en Epi 23/41 ne peut plus incorporer les épiplasmines nouvellement synthétisées. D'après ces observations, on peut conclure que le RNAi de représentants du groupe 1 symétrique, Epi 23 et Epi 41, induit des altérations locales spécifiques des composants du cytosquelette sous-membranaire chez la paramécie.

L'analyse fonctionnelle des deux autres groupes symétriques, groupes 3 et 5 qui sont moins exprimés que le groupe 1, a été réalisée.

Pour le groupe 3, nous avons choisi deux membres appartenant au sous-groupe 3b, Epi 25 et Epi 46 ayant 17 et 16 ESTs respectivement. Pour le sous-groupe 3a et afin de tester la fonctionnalité d'une épiplasmine peu exprimée nous avons choisi Epi 30 ayant 1 EST. Quant au groupe 5, nous avons choisi deux candidats, un appartenant au sous-groupe 5a qui est l'Epi 51 avec 6 ESTs et un au sous-groupe 5b qui est l'Epi 48 avec 2 ESTs. Les candidats choisis sont entourés sur l'arbre de similarité ci-dessous.



Pour ces deux groupes symétriques, seule l'extinction de l'Epi 46 a induit un phénotype. Au bout de 20 heures après l'induction, on peut observer un certain nombre de cellules en forme de poires (fig.39A) ; entre 24 et 48 heures, on obtient deux cellules incapables de se séparer et formant entre elles un angle de 45° donnant le phénotype « Boomerang » (fig.39B) puis des amas cellulaires constituant ce qu'on appelle des plasmodes (fig.39C). Ces résultats sont donc similaires à ceux obtenus pour les épiplasmies symétriques du groupe 1.

Par immunofluorescence, on n'a pas remarqué de changement au niveau des écailles.

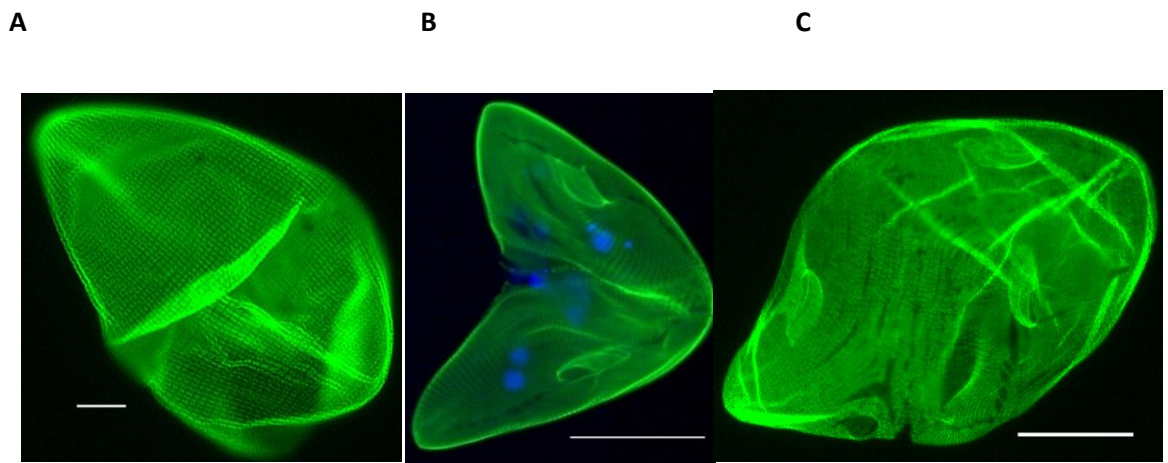


Fig. 39 : Effets du RNAi de l'épiplasmine symétrique Epi46 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32. Le RNAi de l'épiplasmine 46 qui est symétrique et appartenant au sous-groupe 1a, induit des perturbations au niveau de la cellule, commençant par une forme de poires (A), ensuite il y a blocage de la cytokinèse aboutissant à la forme « Boomerang » (B), suivi par l'apparition des formes monstrueuses « sorte de plasmodes » (C). Barres : A= 20 μ m ; B= 50 μ m ; C= 50 μ m.

II.2.2. Effets du RNAi des épiplasmiques asymétriques

a. Effet à l'échelle globale de la cellule

Après extinction des épiplasmiques du groupe 2a qui sont les Epi 2, Epi 20 et Epi 18, protéines asymétriques représentées sur l'arbre de similarité (cladogramme 1 des épiplasmiques) nous avons obtenu les phénotypes suivants.

Au bout de 18 heures, le RNAi par l'Epi 2 provoque un arrondissement des cellules induites sauf au pôle antérieur, provoquant des cellules en forme de poires (fig.40B) montrant ainsi un changement dans la forme cellulaire de la plupart des cellules induites par comparaison avec les cellules normales du témoin (fig.40A). Deux heures après, on remarque que presque toutes les cellules sont incapables de se diviser au stade deux cellules et qu'elles forment entre-elles un angle de 45° constituant ainsi des formes boomerang (fig.40C). Au bout de 35 à 40 heures, la totalité de ces boomerangs se transforme en plasmodes (fig.40D).

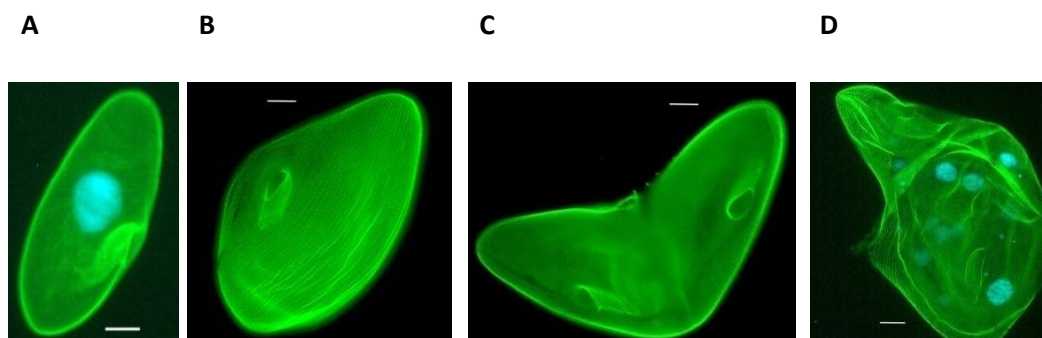


Fig. 40 : Effets du RNAi de l'épiplasmine asymétrique Epi 2 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32. Le RNAi de l'épiplasmine 2 qui est asymétrique et appartenant au sous-groupe 2a, induit des perturbations au niveau de la cellule par rapport à la cellule normale (A), commençant par une forme de poires (B), ensuite il y a blocage de la cytokinèse aboutissant à la forme « Boomerang » (C), suivi par l'apparition des formes plasmodes (D). Barres : A= 20 μ m ; B=20 μ m ; C=20 μ m ; D=20 μ m.

Avec le RNAi de l'Epi 18, au bout de 16 heures, on note un changement de la forme cellulaire commençant par l'obtention des formes arrondies des cellules, sorte de poires (fig.41A); après 18 heures, la plupart des cellules se présentent sous la forme boomerang (fig.41B), Au bout de 24 à 30 heures après l'induction, la quasi-totalité de ces boomerangs deviennent des plasmodes (fig.41C).

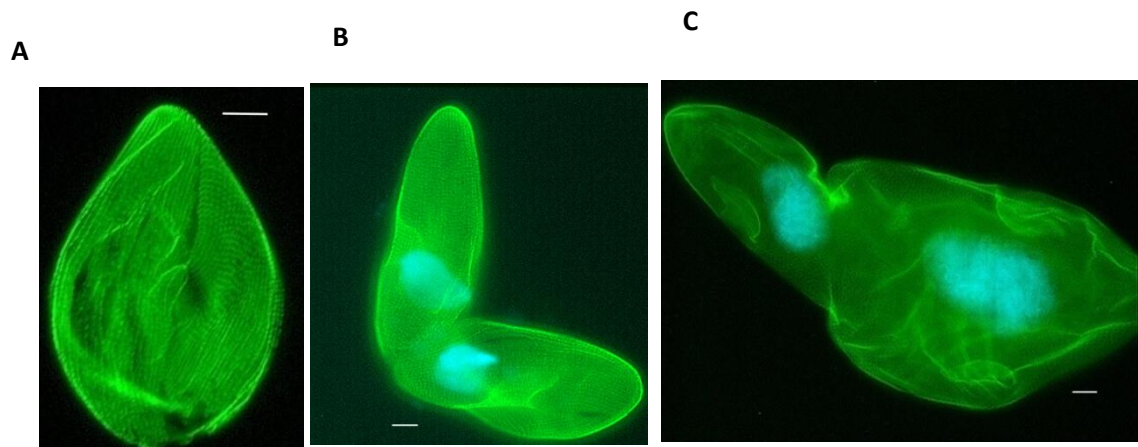


Fig. 41 : Effets du RNAi de l'épiplasmine asymétrique Epi 18 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32. Le RNAi de l'épiplasmine 18 qui est asymétrique et appartenant au sous-groupe 2a, induit des perturbations commençant par une forme de poires (A), ensuite il y a blocage de la cytokinèse aboutissant à la forme « Boomerang » (B), suivi par l'apparition des formes plasmodes (C). Barres : A=20 μ m ; B=10 μ m ; C=20 μ m.

Le RNAi de l'Epi 20 induit au bout de 20 heures un changement de la forme cellulaire (fig.42B), les cellules deviennent plus arrondies que la normale (fig.42A). Après 24 heures, on observe un blocage de la séparation cellulaire au stade deux cellules aboutissant à la forme boomerang (fig.42C) qui suite à des échecs successifs de séparation cellulaire se transforment en plasmodes au bout de 48 heures (fig.42D).

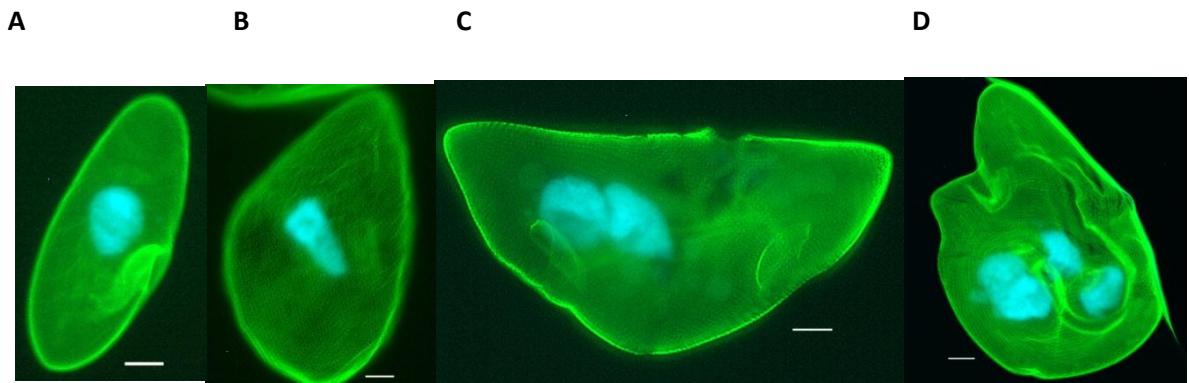


Fig. 42 : Effets du RNAi de l'épiplasmine asymétrique Epi 20 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32. Le RNAi de l'épiplasmine 20 qui est asymétrique et appartenant au sous-groupe 2a, induit des perturbations au niveau de la cellule par rapport à la cellule normale (A), commençant par une forme de poires (B), ensuite il y a blocage de la cytokinèse aboutissant à la forme « Boomerang » (C), suivi par l'apparition des formes plasmodes (D). Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI. Barres : A=20 μ m ; B=10 μ m ; C=20 μ m ; D=20 μ m.

Dans le cas de l'Epi 20, le pourcentage de cellules présentant un phénotype est plus petit que celui obtenu dans le cas de RNAi des Epi 2, Epi 18 et Epi 20 ; Seul un quart des cellules présentes dans la culture change de forme et se transforme en boomerangs qui finissent par donner des formes plasmodiales. Nous pouvons conclure que lors de l'extinction de ces trois épiplasmines asymétriques, nous obtenons le même phénotype à l'échelle globale de la cellule mais avec des rendements et des intervalles de temps différents.

Pour savoir si nous avons fait le bon choix concernant les épiplasmines représentatives du groupe 2a, nous avons testé l'extinction de Epi 34 qui a 1 EST et appartenant au sous-groupe 2b possédant 14 ESTs.

L'extinction de Epi 34 induit le même phénotype que les épiplasmines du sous-groupe 2a, mais avec un rendement plus faible : en partant des mêmes conditions pour les expériences de RNAi avec 10 cellules de départ, Epi 34 ne produit que 2 ou 3 formes boomerang après 72 heures tandis qu'avec les épiplasmines du sous-groupe 2a qui sont plus exprimées, la plupart des cellules en culture sont transformées en boomerang au bout de 24 heures et en formes plasmodiales au bout de 48 heures.

Au sein de cette classe asymétrique, le fait que la délétion de chaque sous-groupe ne puisse pas être compensée par la présence d'une autre isoforme suggère que ces protéines ne sont pas isofonctionnelles, et que la stœchiométrie entre les différentes isoformes est essentielle au maintien de la structure.

b. Effet sur l'organisation corticale : effet locaux

L'effet du RNAi sur l'organisation corticale a été étudié par immunofluorescence en utilisant l'anticorps CTS32.

Avec le RNAi des trois épiplasmines asymétriques (Epi 2, Epi 18 et Epi 20), on observe une altération dans la duplication des unités corticales, résultant dans la production d'unités corticales de tailles inégales. On note une aberration de la forme de l'écaille (fig.43A « 2 »). Par rapport à la forme des écailles normales d'une cellule sauvage (fig.43A « 1 »).

En absence de RNAi, la duplication d'une écaille combine un allongement longitudinal suivi d'une segmentation dont le plan de clivage est perpendiculaire à la cinétie. Dans le cas du RNAi de ces trois épiplasmines asymétriques, on peut observer que le plan de scission peut être oblique par rapport à la cinétie aboutissant à des doublements locaux au niveau des

cinéties (Fig.43B). Cela suggère que ce type asymétrique des épiplasmines jouerait un rôle de guide du plan de clivage des écailles épiplasmiques. Une étude plus approfondie des appendices ciliaires pourrait nous aider à mieux déterminer le rôle de ces épiplasmines dans la polarité des écailles.

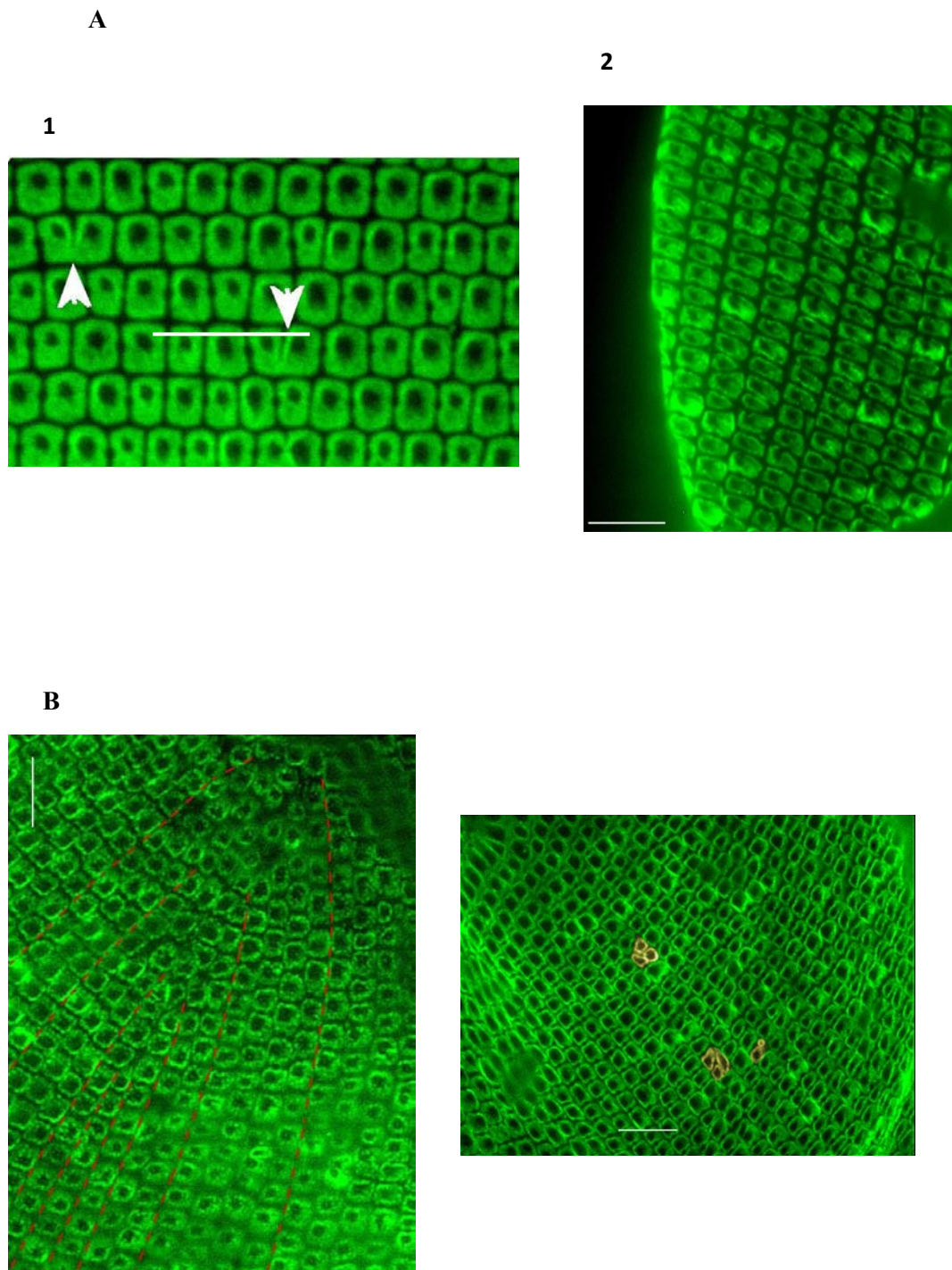


Fig. 43 : Altérations au niveau local suite au RNAi des épiplasmiques asymétriques.

A- Le RNAi de l'Epi 2, Epi 18 et Epi 20 qui sont des protéines asymétriques appartenant au sous-groupe 2a provoque des formes aberrantes au niveau de l'écaille (2) par rapport aux écailles normales d'une cellule sauvage (1). B- De même, suite à ce mécanisme on obtient des segmentations mal-orientées des unités corticales, aboutissant à des doublements locaux au niveau des cinéties. Barres : A= 5 μ m (1 et 2), B= 5 μ m.

c. Cas de l'extinction de l'Epi 38

Nous avons choisi d'étudier l'Epi38. Cette épiplasmine a été placée par les études de phylogénie et de synténie avec le sous-groupe 2b. Par contre, en faisant les alignements avec la méthode HCA, elle ne s'associe pas clairement avec les groupes asymétriques. Elle présente 6 ESTs.

Le RNAi de l'Epi 38 provoque les mêmes résultats que les épiplasmies du sous-groupe 2a, aussi bien au niveau local qu'au niveau global et dans les mêmes délais de temps d'apparition des phénotypes, c'est-à-dire, apparition des formes boomerangs après 24 heures (fig.44B) et des formes plasmodiales après 48 heures (fig.44C) en les comparant avec les formes normales des cellules sauvages (fig.44A).

Concernant l'étude sur l'organisation corticale en utilisant l'anticorps CTS32, on remarque la présence de duplications d'écailles mal orientées (non perpendiculaires à la cinétie), ce résultat ressemble au RNAi de l'Epi 2 (fig.44D)

Nous pouvons suggérer que bien que l'Epi 38 soit légèrement différente d'un point de vue structural, elle appartient bien au groupe 2 au niveau fonctionnel.

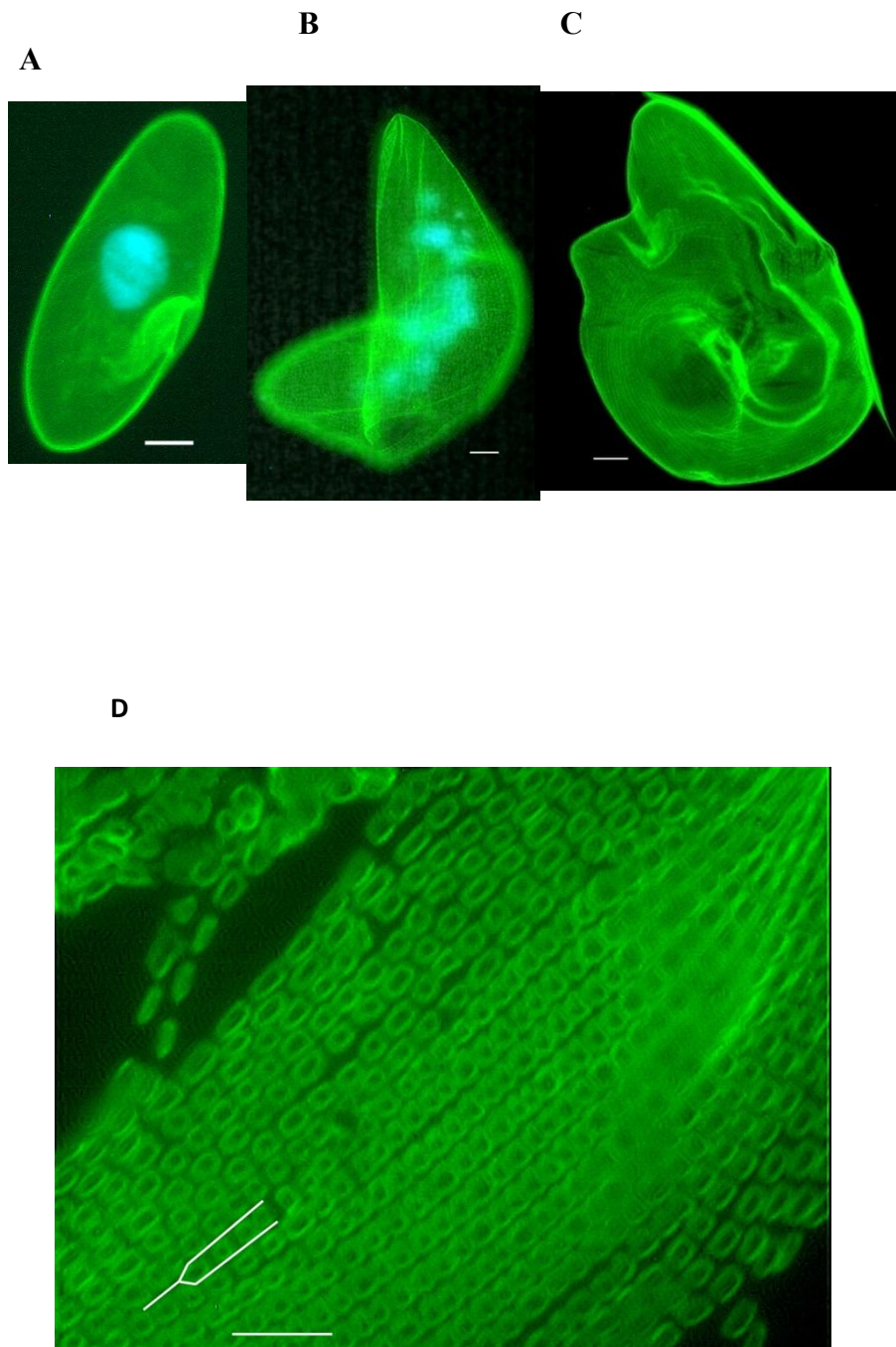


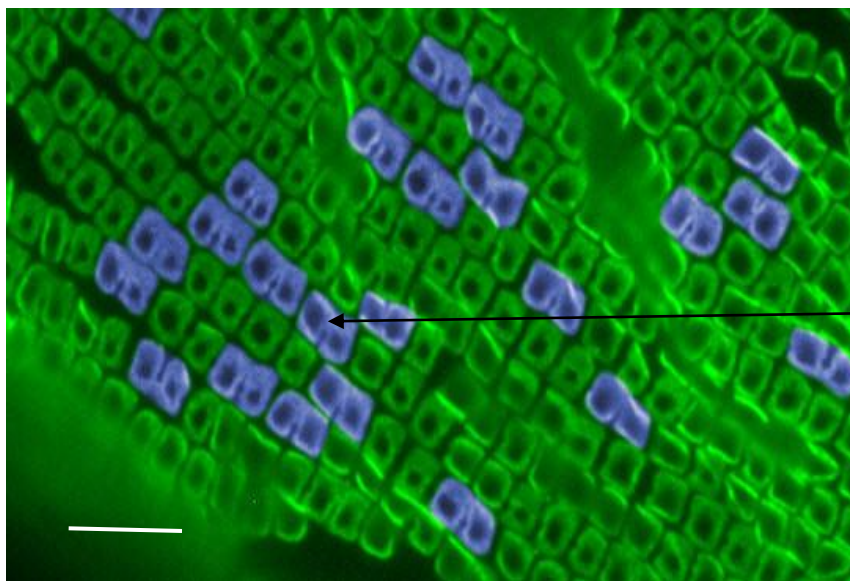
Fig. 44 : Effets du RNAi de l'épiplasme asymétrique Epi 38 sur des cellules de paramécies fixées et immunomarquées par le CTS32. Le RNAi de l'épiplasme 38 qui est asymétrique et appartenant au sous-groupe 2b, induit des perturbations au niveau de la cellule par rapport à la cellule sauvage (A), ainsi il y a blocage de la cytokinèse aboutissant à la forme « Boomerang » (B), suivi par l'apparition des formes plasmodes (C). De même, suite à ce mécanisme on obtient des segmentations mal-orientées des unités corticales encadrées en blanc, aboutissant à des doublements locaux au niveau des cinéties (D). Les noyaux sont colorés en bleu par le DAPI. Barres : A=20 μ m ; B= 10 μ m ; C= 20 μ m ; D= 5 μ m.

II.2.3 Effets du RNAi des épiplasmines atypiques: sans géométrie définie

Nous avons choisi Epi 11, appartenant au sous-groupe 4a ayant 96 ESTs. Cette épiplasmine a 20 ESTs et elle n'a pas le domaine FLLF dans son extrémité C-terminal.

Le RNAi de Epi 11 provoque un ralentissement dans le déplacement nage des cellules ainsi qu'un allongement de la durée du cycle cellulaire. Cela est déterminé en comparant le nombre des cellules Epi11 au nombre de cellules témoins. Ainsi le nombre des cellules Epi 11 est plus petit que celui des cellules existantes dans la culture témoin.

En immunofluorescence, en utilisant l'anticorps monoclonal CTS32, on voit une accumulation d'unités corticales en cours de duplication (fig.45). Dans une cellule sauvage, on ne voit qu'occasionnellement ces figures d'écailles en cours de duplication, car cette étape semble être rapide.



Accumulation des duplications non accomplies des unités corticales

Fig. 45 : Effet du RNAi des épiplasmines Atypiques. Dans les cellules de RNAi de l'Epi 11, on observe des écailles en cours de duplication avec une fréquence 'anormalement' élevée ; on peut suggérer que le processus de clivage de l'écaille est ralenti. Barre = 5µm.

Nous avons choisi également deux autres candidats du groupe 4. Ces deux candidats possèdent le domaine FLLF dans leurs extrémités C-terminales. Ces deux candidats sont l'Epi 40 ayant 4 ESTs et l'Epi 43 ayant 15 ESTs.

Suite aux expériences de RNAi de ces deux épiplasmines, aucun phénotype n'a pu être mis en évidence avec les outils dont on dispose.

- **Conclusion**

La diminution d'expression des épiplasmines symétriques et asymétriques, malgré la spécificité des séquences, aboutit à une réponse cellulaire commune qui se traduit par un changement de la forme cellulaire, suivi par le blocage de la cytokinèse et l'apparition des formes plasmodiales. Il semble que lorsqu'on touche à un représentant appartenant à n'importe quel sous-groupe, on obtient le même phénotype à l'exception des épiplasmines atypiques et de celles du groupe 5. Cela suggère que ces perturbations ne sont pas spécifiques de la disparition de chaque épiplasmine, mais de l'altération d'un processus coordonné des constituants de l'épiplasme.

Au niveau local, la forme des unités corticales observée au cours des divisions sous les conditions de RNAi, dépend des types structuraux de chaque groupe. Cela suggère qu'il pourrait exister une spécificité du mécanisme d'ARN interférence. Ainsi, on a une accumulation des agrégats entre les unités corticales dans le cas des épiplasmines symétriques et une aberration de la forme de ces unités ou des segmentations mal-orientées de ces dernières avec le RNAi des épiplasmines asymétriques.

Donc, la question qui se pose c'est de savoir pourquoi pour des effets locaux différents, il y a des effets globaux similaires. On peut imaginer que ces effets locaux différents pourraient influencer à un certain moment de la division cellulaire une fonction commune fondamentale pour la séparation normale des deux cellules après la division. De ce fait, on a des effets globaux identiques montrant le rôle des épiplasmines symétriques et asymétriques dans l'intégrité de l'épiplasme.

Quoiqu'il en soit, ces expériences suggèrent que les classes symétriques et asymétriques des épiplasmines sont indispensables pour la formation de l'unité corticale.

Le RNAi de l'epi 11 montre que cette épiplasmine serait impliquée dans la réussite ou la terminaison de la division de l'unité corticale. Son altération induit alors un retard du cycle de division.

Finalement, comme les phénotypes locaux obtenus suite à l'inactivation des représentants de chaque groupe d'épiplasmies sont différents. Cela montre que ces molécules ne sont pas isofonctionnelles et montre en même temps que les résultats des analyses *in silico* étaient raisonnés. Ainsi, on a pu discerner deux fonctions distinctes de l'épiplasma. Ces deux fonctions sont : la structuration des unités corticales et la division de la cellule avec les épiplasmies symétriques et asymétriques d'une part et l'influence sur la réalisation d'un processus de finalisation de la division des écailles d'autre part. Cela implique une grandeur temporelle pour la morphogenèse des unités corticales.

De même, le fait qu'avec un certain nombre d'épiplasmies comme l'Epi 25, l'Epi 30, l'Epi 40 et l'Epi 43, il n'y ait pas de phénotypes visibles, suggère soit que la stœchiométrie entre les différentes isoformes de ces épiplasmies n'est pas essentielle pour maintenir l'intégrité de l'épiplasma, ce qui impliquerait une redondance fonctionnelle entre chacune de ces épiplasmies et les composants du sous-groupe concerné, soit que ces protéines n'ont pas vraiment de rôle déterminé dans l'organisation de l'épiplasma.

II.3. Localisations des épiplasmies

Les résultats obtenus avec les expériences de l'ARN interférence sont intéressants pour l'étude fonctionnelle de cette famille multigénique mais ils ne sont pas suffisants. Pour cela, il est important de localiser ces protéines dans la cellule.

Nous avons choisi d'utiliser l'approche fonctionnelle en utilisant des protéines marquées avec la GFP en les clonant dans le vecteur pPXV-eGFP décrit par Hauser et al., (2000) dans lequel la phase codante de la GFP est flanquée par les régions régulatrices du gène endogène de la calmoduline de la paramécie. Ce vecteur contient des séquences télomériques de *Tetrahymena* qui vont aider à la stabilisation de l'ADN injecté dans le macronoyau.

La construction plasmidique est injectée dans le macronoyau de la paramécie pour suivre une fluorescence sur cellules vivantes.

II.3.1. Localisation des épiplasmines symétriques (groupe 1) fusionnées à la GFP

L'Epi 41 montre un adressage uniforme dans les unités corticales de la paramécie lorsqu'elle est fusionnée à la GFP (Fig.46).

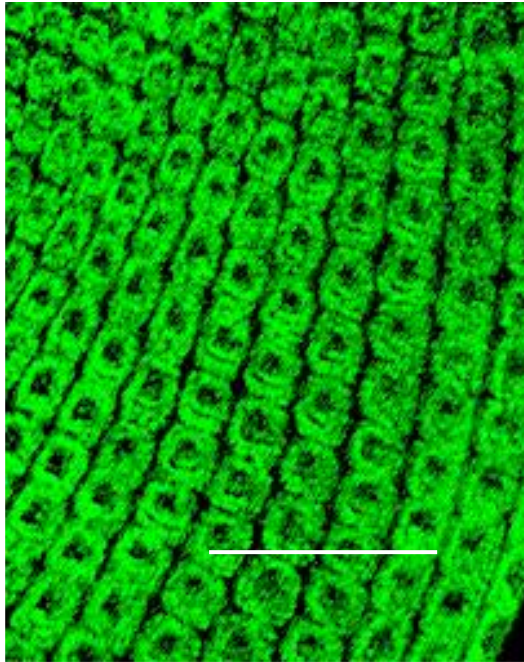


Fig.46: Localisation de l'Epi 41 dans *P.tetraurelia*. L'Epi 41 montre une localisation uniforme dans l'écaille épiplasmique lorsqu'elle est fusionnée à la GFP. Barre= 5 μ m

II.3.2. Localisation des épiplasmines asymétriques fusionnées à la GFP

L'Epi 20, épiplasmine asymétrique appartenant au sous-groupe 2a montre la même localisation que l'Epi 41 (fig.47) avec une localisation uniforme dans les unités corticales. Cette localisation avait déjà été obtenue avec une autre épiplasmine asymétrique, l'Epi 1 clonée par Pomel et al. en 2006.

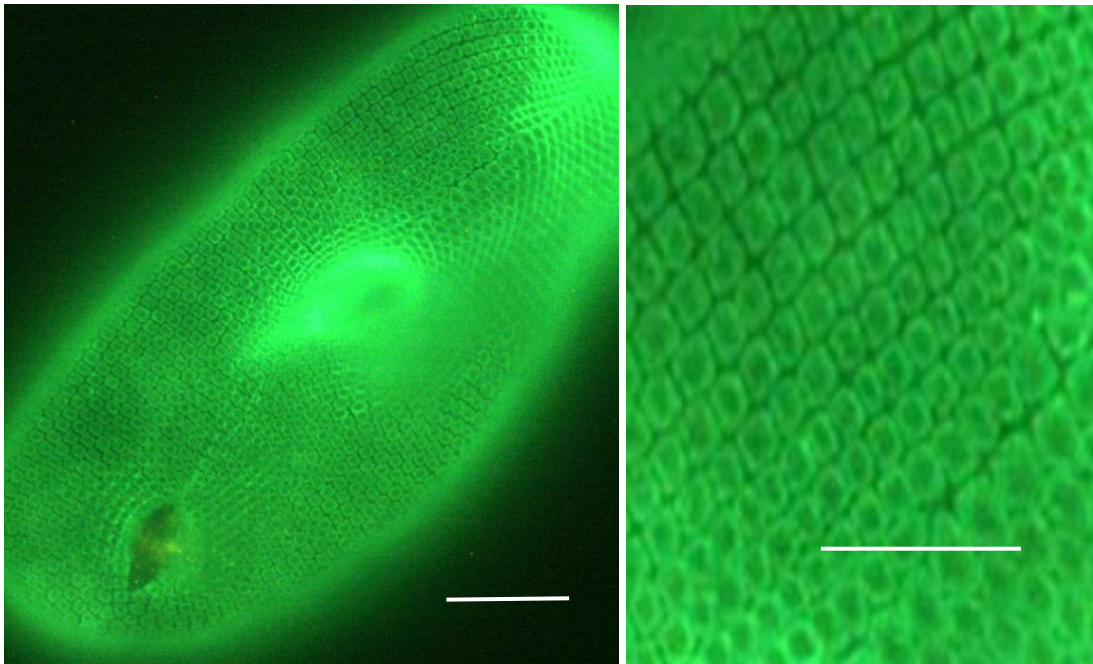
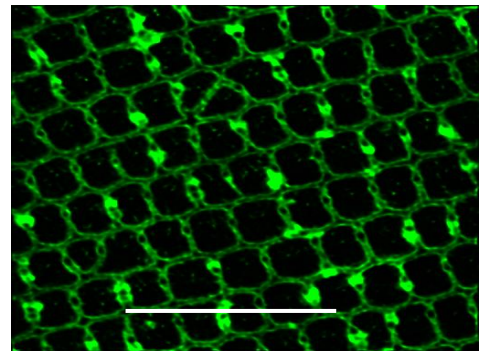
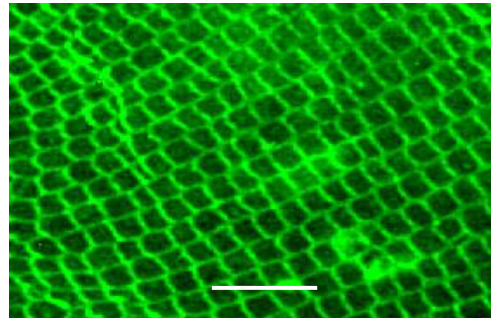
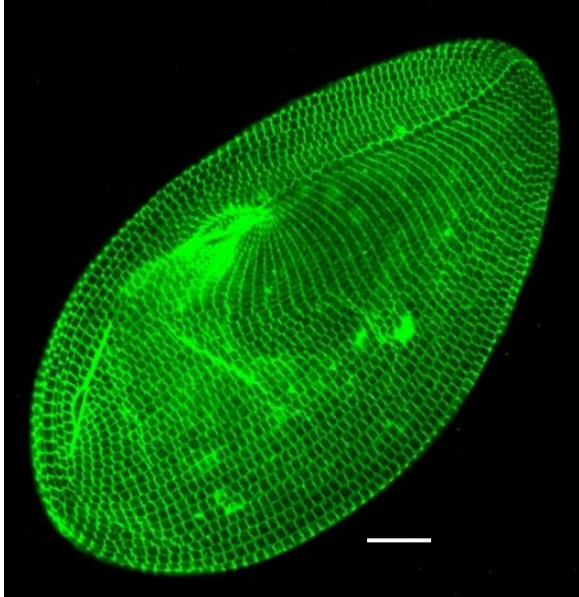
A**B**

Fig.47: Localisation de l'Epi 20 dans *P.tetraurelia*. L'Epi 20 montre une localisation uniforme dans l'écaille épiplasmique lorsqu'elle est fusionnée à la GFP. Barres : A= 10 μ m ; B=5 μ m

II.3.3. Localisation des épiplasmines Atypiques fusionnées à la GFP

On observe que l'Epi 11 fusionnée à la GFP s'accumule sur le pourtour de l'écaille épiplasmique. L'Epi 11 est adressée à la périphérie des unités corticales tout au long du cycle cellulaire (fig.48A). Les cellules injectées par la construction contenant « Epi 11-GFP » ont été marquées par l'anticorps monoclonal CTS32 qui décore les unités corticales et l'appareil oral. Les deux marquages ont été superposés (fig.48B). Ainsi l'anticorps monoclonal CTS32 décore les écailles (en rouge) et l'Epi 11 fusionnée à la GFP se localise à la périphérie des écailles (en vert), cette superposition des deux marquages nous permet de bien discerner la localisation spécifique de l'Epi 11 à la périphérie des écailles.

A



B

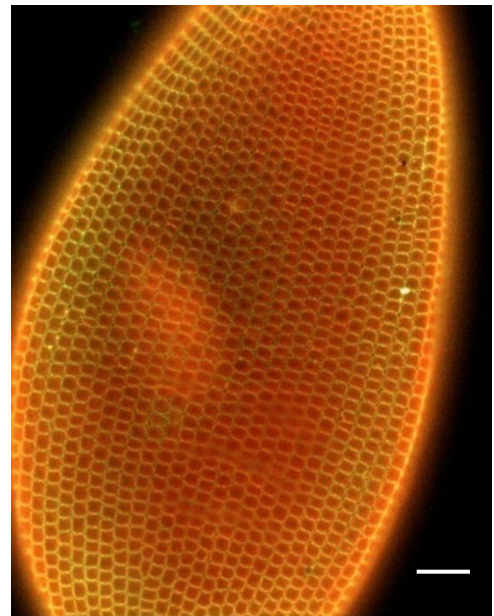
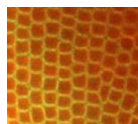
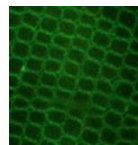
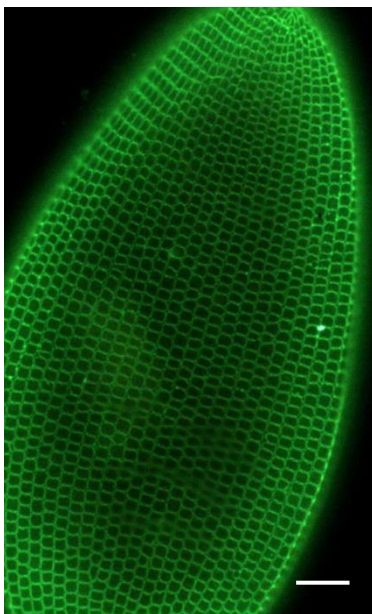


Fig.48 : localisation de l'Epi 11 dans *P.tetraurelia*. A- L'Epi 11 se localise à la périphérie des unités corticales lorsqu'elle est fusionnée à la GFP. B- On confirme cette localisation des cellules exprimant la GFP (vert), fixées et doublement marquées par l'anticorps monoclonal « CTS32 » (rouge). Les encarts montrent du haut en bas, la GFP (vert), l'anti-épiplasma (rouge) et la fusion entre les deux images (orange) Toutes les barres de cette figure sont égales à 5µm..

L'Epi40-GFP s'adresse à la périphérie des unités corticales comme l'Epi 11, mais juste au moment de la division et elle n'est pas présente dans les champs invariants du cortex (fig.49).

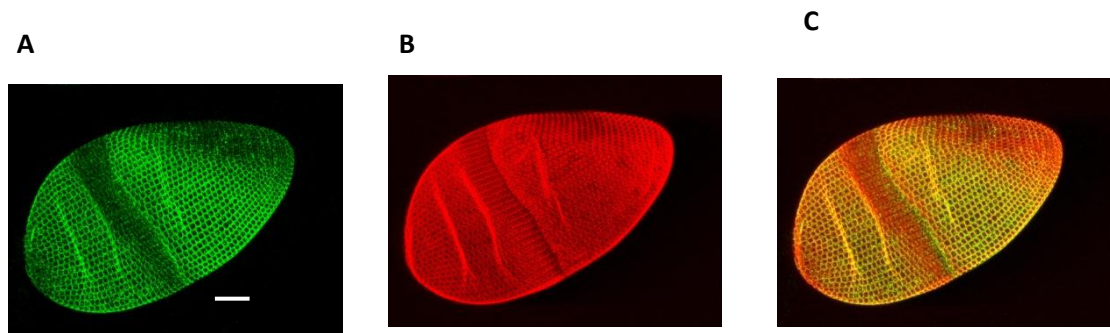


Fig.49 : Localisation de l'Epi 40 dans *P.tetraurelia*. (A) L'Epi 40 fusionnée à la GFP (en vert) s'adresse à la périphérie des unités corticales comme l'Epi 11, mais juste au moment de la division et elle n'est pas présente dans les champs invariants de l'épivasme. (C) on voit une superposition de l'image de L'Epi 40 fusionnée à la GFP (vert) et de la même cellule marquée avec le CTS3 (en rouge, B). Barres : A= 5 μ m ; B= 5 μ m, C= 5 μ m.

L'Epi 43 appartenant au sous- groupe 4a et possédant le domaine FLLF, a été fusionnée à la GFP et elle se localise à la périphérie des unités corticales tout au long du cycle cellulaire comme l'Epi 11 du sous-groupe 4a (fig.50).

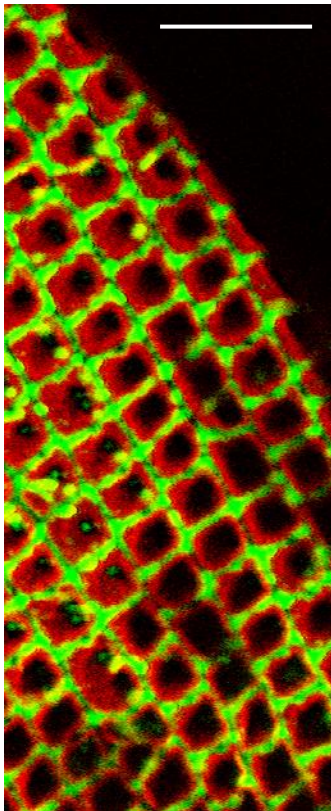


Fig.50 : Localisation de l'Epi 43 dans P. tetraurelia. L'Epi 43 appartenant au sous-groupe 4a se localise à la périphérie des écailles. On voit un comarquage avec le CTS 32 (rouge) et de l'Epi 43 couplée à la GFP (vert). Barre= 5 μ m.

II.3.4. Localisation des épiplasmines des autres groupes symétriques (groupes 3 et 5) fusionnées à la GFP

L'Epi 30-GFP montre une localisation plus centrale dans l'écaille c'est-à-dire plus proche du corps basal, on peut donc parler d'une épiplasmine péricinétosomale, c'est-à-dire autour du corps basal (fig.51).

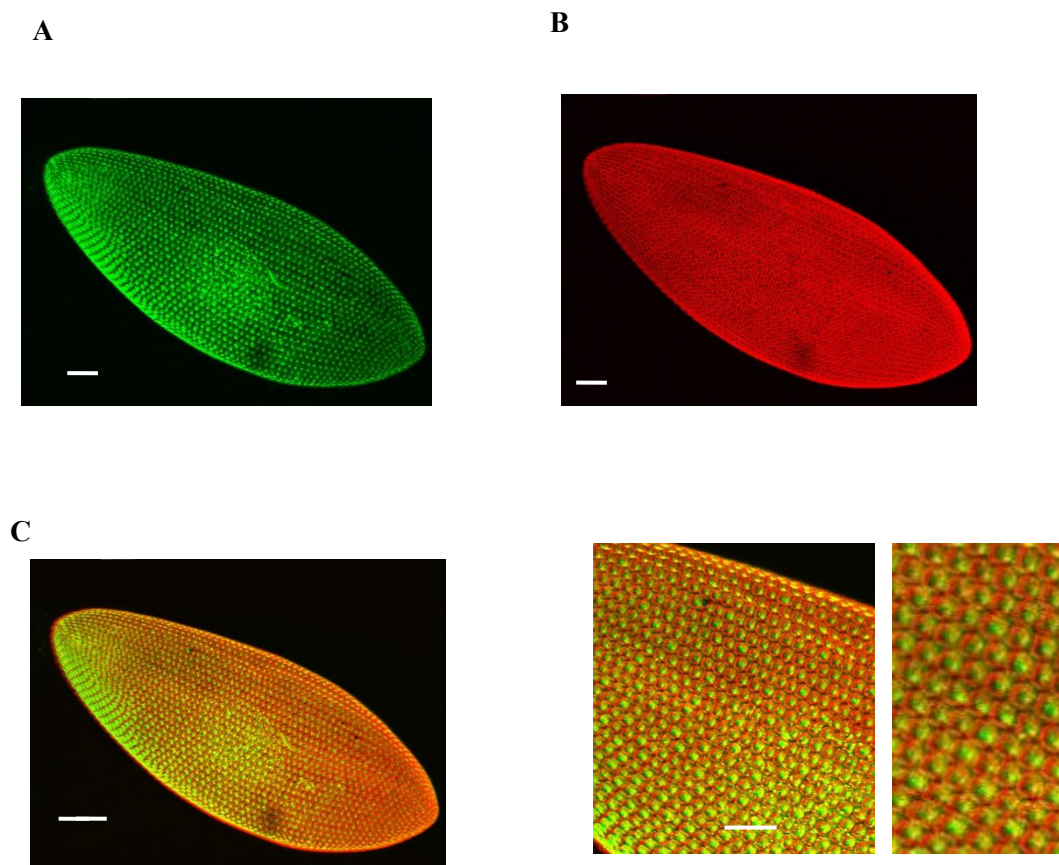


Fig.51 : Localisation de l'Epi 30 dans *P. tetraurelia*. L'Epi 30 qui est une protéine symétrique appartenant au sous-groupe 3a, montre une localisation plus centrale dans l'écaille, on parle d'une protéine péricinétosomale. (C) On voit une superposition d'une cellule dans laquelle est exprimée l'Epi30 fusionnée à la GFP (A, vert) et la même cellule marquée avec le CTS32 (B, rouge) Barres : A= 5 μ m ; B= 5 μ m ; C=5 μ m.

Concernant le groupe 5 composé par les petites épiplasmines, nous avons essayé de localiser l'Epi 48 et l'Epi 51.

Avec l'Epi 48-GFP, nous n'avons obtenu aucune localisation précise dans la cellule.

L'Epi 51 fusionnée à la GFP se localise au niveau du corps basal (fig.52B), elle occupe un territoire dont la surface est la même que celle marquée par l'anticorps ID5 qui est un anticorps monoclonal décorant les tubulines glutamylées (fig.52A). Donc, l'Epi 51 se localise probablement dans le corps basal plutôt qu'à sa périphérie. Considérant la relation de l'épiplasme avec les corps basaux au niveau de la plaque terminale, nous supposons fortement que l'Epi 51 puisse être localisée au niveau de la plaque terminale. Une approche par la microscopie électronique devrait donner plus d'informations et définir clairement la localisation de l'Epi 51.

De plus, la protéine Epi 51- GFP se localise également de manière systématique très près du corps basal. Elle pourrait définir un nouveau territoire correspondant à l'emplacement du précinétosome.

Nous avons cloné d'autres épiplasmines pour les localiser, celles-ci sont : l'Epi 34 appartenant au sous-groupe 2b qui n'est pas encore exploré pour le moment, l'Epi25 et l'Epi 46 appartenant au sous-groupe 3b, ces deux protéines ayant 17 et 16 ESTs respectivement. Le tableau ci-dessous résume les épiplasmines fusionnées à la GFP et qui n'ont pas été injectées pour le moment.

Epiplasmines fusionnées à la GFP et non injectées pour le moment	
Epi 34	: Asymétrique, sous-groupe 2b, 1EST
Epi 46	: Symétrique, sous-groupe 3b, 16 ESTs
Epi 25	: Symétrique, sous-groupe 3b, 17 ESTs

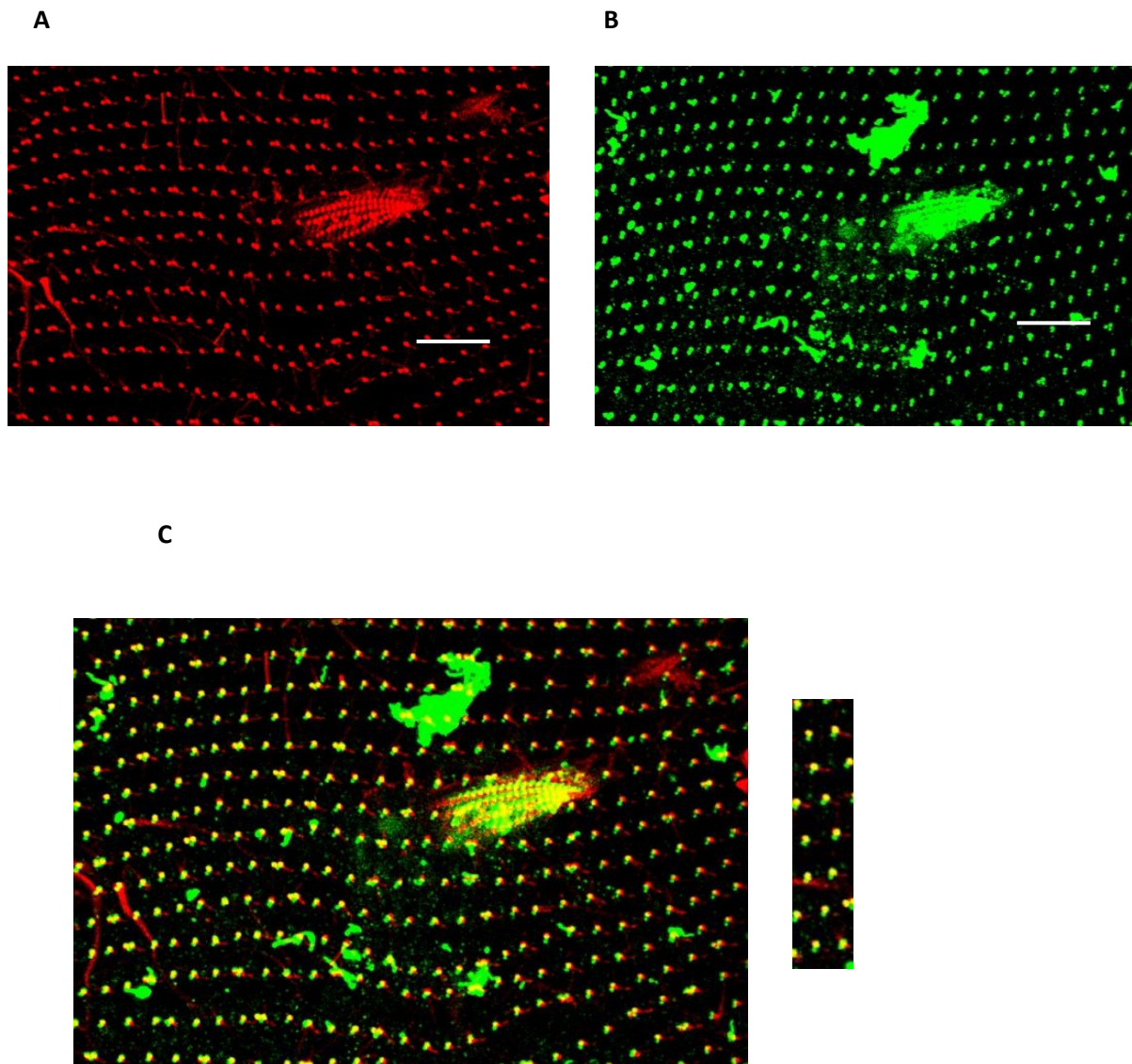


Fig.52 : Localisation de l'Epi 51 dans *P.tetraurelia*. (A) Marquage avec l'anticorps ID5 qui décore les tubulines glutamylées permettant de visualiser les corps basaux (rouge), (B) l'Epi 51 fusionnée à la GFP se localise au niveau du corps basal (vert), (C) Comarquage de l'Epi 51-GFP avec l'anticorps ID5 montrant la colocalisation de l'Epi 51 et du corps basal (Jaune), de même on remarque que l'Epi 51 décore un matériel très près du corps basal (point vert). Barres : A=5 μ m ; B= 5 μ m ; C=5 μ m.

II.3.5. Localisation de l'épiplasmine asymétrique de *Tetrahymena* fusionnée à la GFP: L'EpiTetra 2

Notre stratégie pour l'étude fonctionnelle de cette famille multigénique est basée sur les données de l'étude structurale. Nous avons montré dans la première partie concernant l'analyse structurale la présence d'orthologues d'épiplasmiques de la paramécie chez *Tetrahymena*. Chaque orthologue a été apparenté à un groupe d'épiplasmiques de la paramécie, à l'exception du groupe 4, pour lequel nous n'avons pas trouvé d'orthologue chez *Tetrahymena*.

Epi T2 fusionnée à la GFP a été injectée à la paramécie. L'examen des cellules montre du matériel qui s'accumule entre les cinéties formant des lignes parallèles (fig.53).

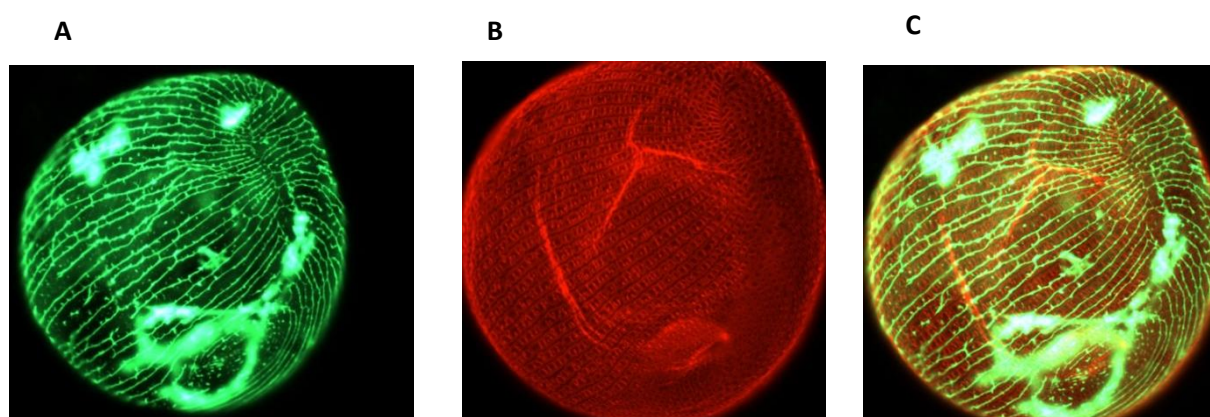


Fig. 53: Localisation de l'Epi tetra2 dans *P.tetraurelia*. La localisation a été déterminée dans les cellules exprimant la GFP (en vert), fixées et double marquées avec l'anticorps monoclonal CTS32 (en rouge). (A) les cellules exprimant la GFP Epi tetra2 montrent des lignes à travers la cellule (vert). (B) les cellules marquées avec le CTS32 décorant les unités corticales (rouge). (C) Une image de fusion entre les deux images.

Ces cellules injectées ont été traitées par l'anticorps monoclonal CTS32 et nous avons superposé les deux marquages. Il n'y a pas de superposition du marquage GFP avec l'anticorps. Cela suggère que l'Epi T2 n'est pas reconnu par CTS32. Cette épiplasmine de *Tetrahymena* ne semble pas interagir avec les autres épiplasmies endogènes suggérant soit une spécificité d'hôte, soit une spécificité d'interaction. Même si les épiplasmies de *Tetrahymena* et de *Paramecium* ont pu avoir une origine commune elles ne sont aujourd'hui pas interchangeables. Cela suggère une fonctionnalisation ou « néofonctionnalisation » spécifique de l'organisation du territoire cortical de chaque type cellulaire. Curieusement, la forme de la paramécie présentant une surexpression de l'épiplasmine de *Tetrahymena* tend à s'arrondir. On notera sur les images, la présence caractéristique d'une région apicale où se rejoignent les cinéties. Cette caractéristique est notable pour une cellule de *Tetrahymena* et non pas pour une paramécie ! Il est osé de se demander si dans ce cas expérimental, la paramécie n'aurait pas tendance à mimer la forme d'un *Tetrahymena*.

Cette expérience, seule, ne suffit pas à engager une réflexion plus profonde. Mais le résultat est suffisamment étonnant pour définir *à posteriori* un protocole d'étude de l'expression d'épiplasmies dans un environnement non homologue.

II.3.6. Localisation de l'Epi 38 fusionnée à la GFP

L'Epi 38-GFP montre une localisation uniforme au sein de l'écaille lorsqu'elle est fusionnée à la GFP (fig.54).

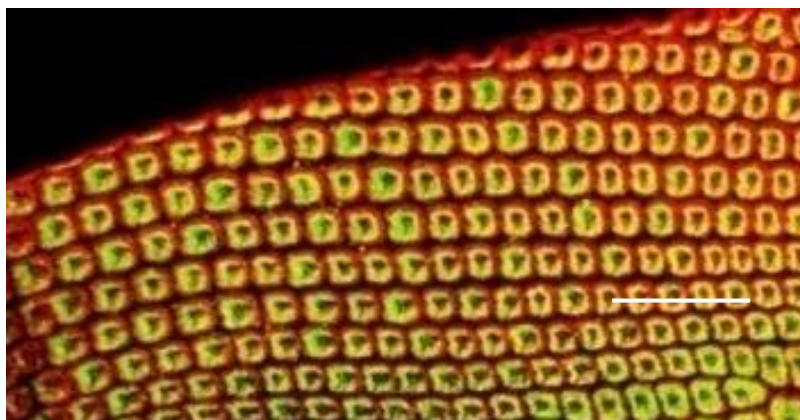


Fig.54: localisation de l'Epi 38 dans *P.tetraurelia*. Co-marquage entre L'Epi 38 fusionnée à la GFP (vert) et l'immunomarquage avec l'anticorps monoclonal CTS32 est (rouge). Barre= 5µm.

II.3.7. Effets de la surexpression des épiplasmines fusionnées à la GFP

Lorsque l'on procède à l'injection de plasmides dans le macronoyau de la paramécie, il est possible d'obtenir une gamme de clones exprimant la GFP à des différents niveaux. Ainsi, on peut parler d'une surexpression relative en fonction de l'intensité de la fluorescence et de l'accumulation de matériel dans le cytoplasme.

a. Effets de la surexpression de l'Epi 41-GFP :

Pour l'Epi41 fusionnée à la GFP, on n'a pas obtenu de phénotypes de surexpression, la forme des cellules et des écailles restent normales.

b. Effets de la surexpression de l'Epi 20-GFP :

Dans le cas de l'Epi 20-GFP, on remarque qu'une forte fluorescence est toujours accompagnée par des anomalies des cellules, ainsi, celles-ci deviennent plus petites que la normale et plus rondes (fig.55A). De plus, des anomalies de division des cellules sont observées : elles restent accrochées, cela provoque la formation des chainettes des cellules avec trois ou quatre cellules attachées les unes aux autres (fig.55B), ce phénotype est également observé avec l'extinction de l'Epi 41 par le RNAi (fig.37C). Il faut signaler que les clones ayant une faible fluorescence conservent une forme et une division normale de la cellule.

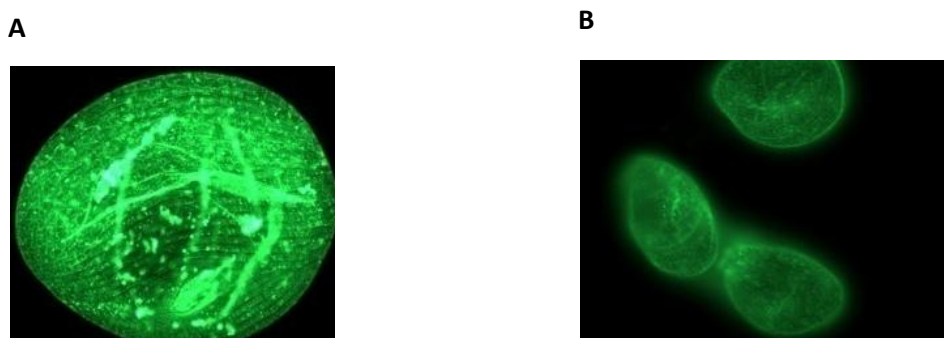


Fig. 55 : Effets de la surexpression de l'Epi 20-GFP. On remarque qu'une forte fluorescence est toujours accompagnée par des anomalies des cellules, ainsi, elles deviennent plus petites que la

normale et plus rondes (A), des anomalies de division des cellules sont observées, elles restent accrochées, cela provoque la formation des chainettes des cellules avec deux ou trois cellules attachées les unes aux autres (B).

On peut suggérer la présence d'un effet dominant négatif de la forte expression de l'Epi 20-GFP. A partir d'un certain seuil d'expression de cette protéine par rapport à l'expression du gène endogène, on perturbe la fonction de base de cette épiplasmine. Cela pourrait être dû soit à la surexpression de l'Epi 20, soit au mauvais repliement de la région C-terminal de l'Epi 20 contenant le domaine FLLF comme conséquence de la présence de la GFP présente après la partie C-terminale de la protéine. Cette perturbation pourrait être induite selon deux mécanismes : 1- la surexpression de l'Epi 20 active qui à un certain seuil induit les anomalies de la forme cellulaire (perturbation de stœchiométrie entre Epi 20 et les autres épiplasmines), 2- l'empoisonnement de la fonction endogène de l'Epi 20 par une protéine mal repliée.

Cet effet obtenu suite à la surexpression ou au mécanisme d'ARN interférence indique que la forme et la division des cellules sont régulées par une précise stœchiométrie entre les différentes épiplasmines.

c. Effets de la surexpression de l'Epi 11-GFP :

La surexpression de l'Epi 11-GFP n'induit aucun phénotype que ce soit au niveau local de l'écaille, ou au niveau global influençant la forme ou la division cellulaire. Cela pourrait être expliqué premièrement par le fait qu'on n'est pas sûr si on est en situation de surexpression car on n'utilise pas de moyens pour mesurer l'intensité de fluorescence. Deuxièmement, si on est en situation de surexpression, on peut suggérer que l'absence de phénotype peut être due à la localisation de cette protéine à la périphérie des unités corticales et par la suite elle n'a pas un rôle primordial pour assurer l'intégrité de l'écaille et la réussite de la division cellulaire. De même, ça pourrait être dû au fait que même l'Epi 11-GFP n'a pas un effet dominant négatif perturbant la structure de l'épiplasme (pas de liens de stoechiométrie strictes avec les autres épiplasmines).

d. Effets de la surexpression de l'Epi 40-GFP :

Comme pour l'Epi 11, avec l'Epi 40 fusionnée à la GFP, on n'a pas obtenu de phénotypes de surexpression. Cela peut être dû au fait qu'on n'est pas en situation de surexpression pour déclencher l'altération de la structure. Dans le cas contraire, on peut imaginer que la

stœchiométrie entre l'Epi 40 exogène et les autres épiplasmines endogènes n'est pas affectée suite à la surexpression de l'Epi 40-GFP.

e. Effets de la surexpression de l'Epi 38-GFP :

La forte surexpression de l'Epi 38 est accompagnée par des anomalies au niveau des écailles: on a aberration des formes des écailles, et un changement de la forme cellulaire, ainsi la cellule a la forme d'une poire (fig. 56A). Par contre, la cellule se divise normalement (fig.56B). Cela pourrait être expliqué par le fait que peut être ces anomalies ne sont pas suffisantes pour perturber la division cellulaire chez la paramécie.

Les cellules ayant une faible quantité de fluorescence maintiennent une forme normale de la cellule et des unités corticales. Ces résultats suggèrent que la déformation des unités corticales et des cellules est due à la surexpression de l'Epi 38 plutôt que la présence de la GFP.

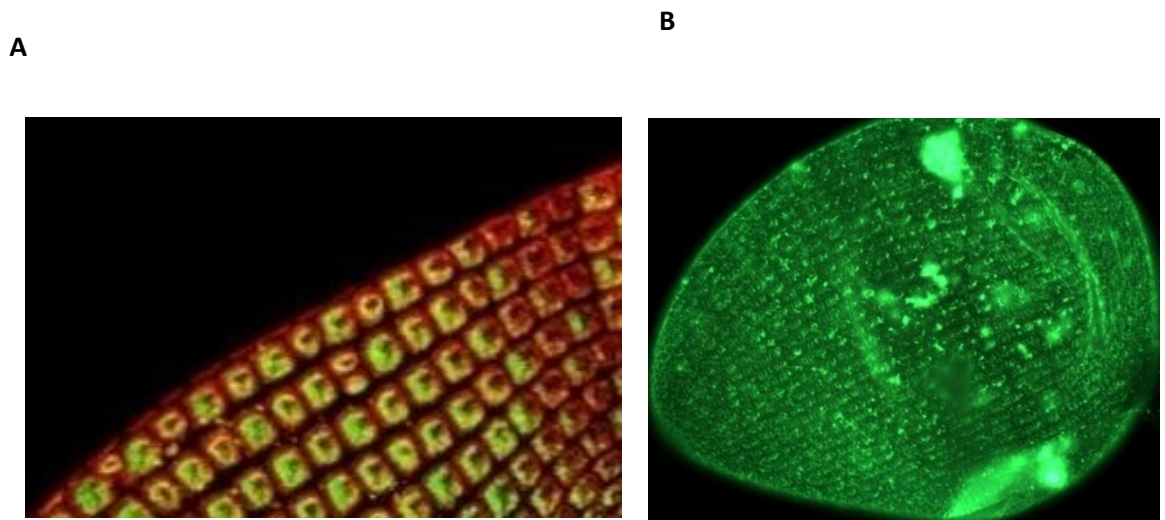


Fig.56: Effet de la surexpression de l'Epi 38-GFP. La forte surexpression de l'Epi 38 est accompagnée par des anomalies au niveau des écailles (A) et par un changement de la forme cellulaire (B). Barre= 5 μ m.

- **Conclusion**

Ces résultats obtenus suite à la localisation des représentants des différents groupes constituant la famille des épiplasmies montrent que les groupes symétriques et asymétriques se localisent dans les unités corticales. On a montré que les épiplasmies appartenant à la classe Atypique se localisent à la périphérie des unités corticales. Toutes les protéines désignées comme faisant partie de la famille multigénique semblent se localiser dans le compartiment épiplasmique. Nous avons mis en évidence des localisations différentielles au sein de l'écaille. On peut alors distinguer deux types de localisations laissant présager deux types d'épiplasmes, un épiplasma appelé « core » constitué par les épiplasmies symétriques et asymétriques montrant un adressage uniforme dans l'écaille et un autre épiplasma périphérique formé par les épiplasmies atypiques constituant le pourtour des écailles. La situation de l'épiplasmie 38 suggère donc qu'elle est une épiplasmie core.

Parmi les groupes symétriques, une épiplasmie se localise autour des corps basaux (epi 30) et est considérée comme une épiplasmie péricinétosomienne et une autre épiplasmie se localise au niveau du corps basal (Epi 51).

L'Epi 51 est supposée être cinétosomale, on pense que cette Epi 51 se localise au niveau de la plaque terminale. Cela suggère que cette protéine constituerait le point de recrutement des autres épiplasmies. De même, l'anticorps monoclonal CTS32 qui reconnaît certaines épiplasmies ne reconnaît pas la plaque terminale. Ce qui montre qu'avec l'utilisation de la GFP on peut aller plus loin qu'avec l'outil anticorps.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'absence des épiplasmies core influence la structure des unités corticales et l'absence des épiplasmies périphériques limitant chaque unité corticale, influence la période de morphogenèse des unités corticales.

Finalement, nous pouvons conclure que la localisation des différentes épiplasmies est en bonne concordance avec les phénotypes obtenus par les expériences d'ARN interférence. Les épiplasmies core jouent un rôle important dans l'intégrité de l'épiplasma tandis que les épiplasmies périphériques pourraient influencer le temps de séparation des deux écailles suite à leur duplication.

En conclusion, et considérant que le corps basal organise son territoire, on peut émettre l'hypothèse que l'écaille épiplasmique est constituée d'un épiplasme au niveau du corps basal, l'épiplasme péricinétosomal puis d'un épiplasme core puis d'un épiplasme périphérique.

Nous pouvons proposer un modèle centrifuge d'organisation de l'unité corticale schématisé dans la figure 57.

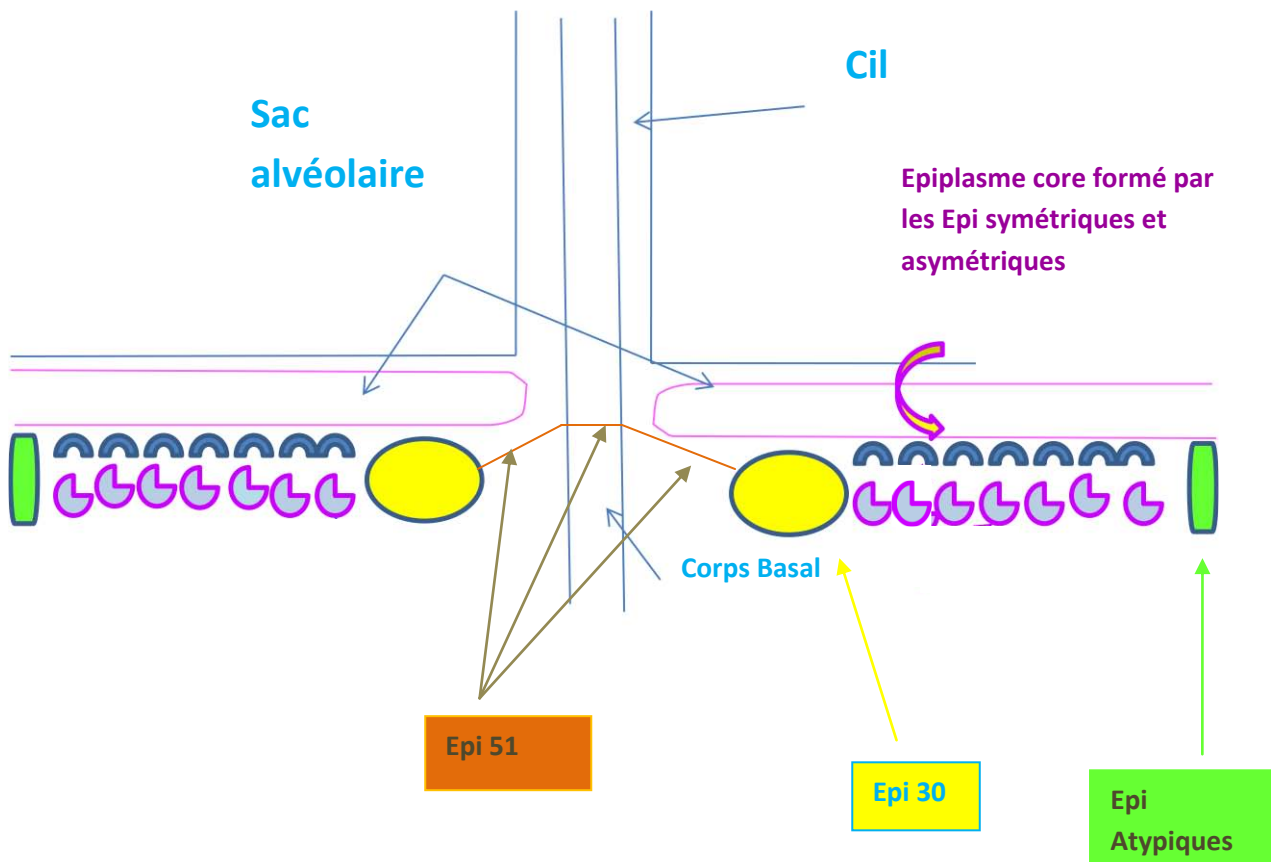
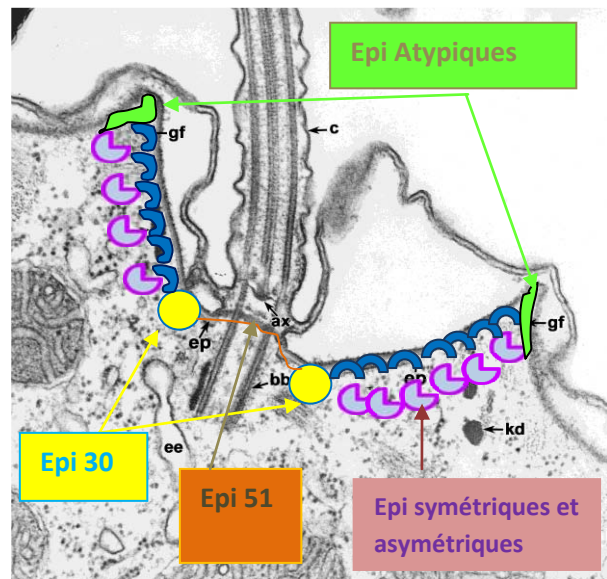
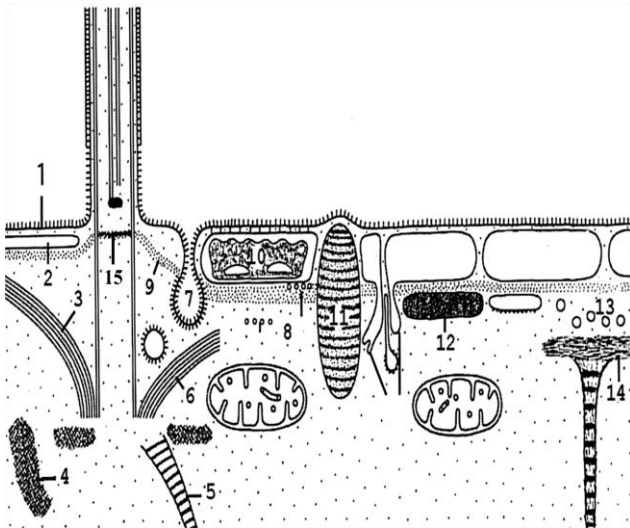


Fig.57 : Modèle centrifuge de la constitution d'une écaille chez la paramécie : Microscopie électronique et schématisation d'une section transversale du cortex. La constitution centrifuge de l'épiplasma chez la paramécie par différents types d'épiplasmines indiqués sur la coupe et le schéma ci-dessus.

Discussion et Perspectives

Discussion générale et perspectives

I. Epiplasmines : une famille multigénique large et interspécifique.

Il est clair désormais que les épiplasmines de la paramécie sont codées par une famille multigénique formée de 51 membres ayant en commun un domaine central très conservé flanqué de deux parties N- et C-terminales composées de modules structuraux caractéristiques organisés en motifs répétés dont la longueur et le nombre sont variables. Ces caractéristiques modulaires sont autant de sondes pour rechercher des homologues dans le génome. L'examen approfondi croisant les analyses BLAST ou HCA, indique que ces caractéristiques définissant une épiplasmine ne sont partagées que par ces 51 séquences. Pour l'instant, nous considérerons donc le nombre d'épiplasmines chez *Paramecium* comme fini. Cette limite permet donc d'envisager les approches post-génomiques de manière sereine.

L'arbre de similarité réalisé avec ces 51 séquences d'ADN chez *Paramecium tetraurelia* a permis d'identifier 5 groupes, chacun subdivisé en deux sous-groupes a et b. L'étude réalisée en utilisant la méthode HCA nous a permis d'identifier les classes structurales associées. L'arrangement variable des différents domaines structuraux identifiés par HCA permet de répartir ces 5 groupes d'épiplasmines en 3 classes : Une classe symétrique, une classe asymétrique et une classe atypique. Cette analyse HCA est en accord avec les résultats obtenus par l'arbre de similarité ce qui montre une cohérence entre les deux types d'analyse. Cet arbre représente donc un bon support pour la modélisation des relations liant ces différentes séquences et nous avons pu y superposer les informations issues des études de synténie, des études structurales et des études d'expression. D'abord outil de travail, cet arbre devient un support réaliste. Il sert de cadre de référence pour analyser et intégrer divers scénarios au sein de cette famille multigénique.

On a montré que cette famille multigénique est interspécifique entre *Paramecium tetraurelia* et *Tetrahymena thermophila*. On a en effet identifié chez *Tetrahymena* quatre séquences d'épiplasmines (Epi T) orthologues à celles de la Paramécie. Ces épiplasmines se déclinent selon les types d'organisations structurales caractérisées chez *Paramecium*. Le recours à la méthodologie HCA a été déterminant. En effet, si les protéines de *Tetrahymena* sont vraiment des épiplasmines, les approches de type cladistique ne définissent pas les classes structurales. Nous montrons alors une répartition en 4 groupes d'épiplasmines et 2 classes structurales. Une situation très similaire à celle observée chez *Paramecium* si l'on excepte l'absence du groupe 4 associé à la classe atypique. Ces données structurales nous donneraient autorité pour corriger manuellement l'arbre de similarité pour y intégrer en bonne place, les 4 épiplasmines de *Tetrahymena*.

Nous avons également montré que cette famille multigénique des épiplasmines pourrait appartenir à une super-famille qui engloberait d'autres protéines partageant avec les épiplasmines un demi-domaine central. Ces protéines ne sont pas caractérisées pour le moment. Leur localisation en utilisant le marqueur GFP permettrait de savoir si elles font partie ou non de l'épiplasme. Une approche fonctionnelle via le mécanisme d'ARN interférence apporterait des informations essentielles sur leur rôle.

II. Histoire d'épiplasme, histoire des génomes

L'analyse de la superfamille des épiplasmines chez les 2 ciliés dont les génomes sont disponibles indique l'utilisation d'un même ensemble de protéines (excepté le groupe 4). Chez *Paramecium* cet ensemble original de protéines se trouve considérablement amplifié.

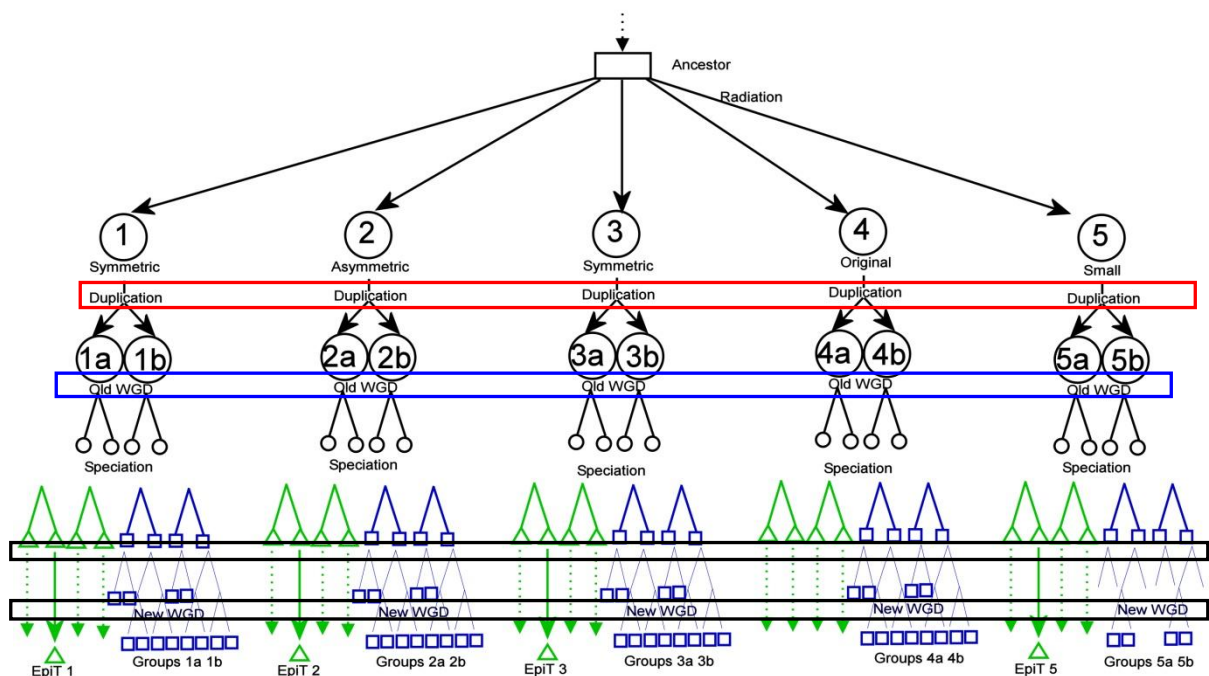
Cette amplification de l'information génétique est la conséquence de l'histoire du génome de *Paramecium*. Clairement démontré par Aury et al. 2006, le génome de la paramécie est le résultat d'au moins 3 duplications totales du génome. Ce résultat original a été obtenu par des approches bioinformatiques considérant la synténie. Les auteurs ont pu reconstruire les génomes successifs issus des duplications et proposent les relations entre paralogues. Le génome de la paramécie représente donc un véritable laboratoire de l'évolution au sein d'une même cellule.

Les événements de duplication du génome sont illustrés par l'histoire des épiplasmines. La conservation des dupliquats successifs des épiplasmines et leurs mises en liaison par les

analyses phylogénétiques et structurales donnent un relief particulier. Au sein de chaque groupe d'épiplasmines, on identifie bien les 3 dernières duplications du génome. L'histoire du génome de paramécie se complète par une duplication antérieure dite « very old ou ancien » qui illustre la séparation des groupes d'épiplasmines en sous groupe a et b. L'analyse de la famille des épiplasmines chez *Paramecium* illustre donc bien l'histoire évolutive de son génome et confirme bien l'existence d'une première duplication.

L'analyse de synténie, bien que puissante pour déterminer les 3 dernières duplications restait ambivalente pour définir cette première (very old) duplication. La famille des épiplasmines fournit un bel exemple pour illustrer ces quatre duplications

Ces notions de synténie ont été élargies à l'analyse comparée des génomes de *Paramecium* et *Tetrahymena*. Sur cette base de réflexion, ces auteurs ont proposé une séparation entre *Tetrahymena* et *Paramecium* peu après la deuxième « old duplication » (Aury 2006). Selon cette analyse, il faut désormais considérer l'histoire des épiplasmines pour chacun de ces modèles et considérer ce que pouvaient être les épiplasmines originales. Ainsi, on suppose donc que l'ancêtre commun possédait les 5 groupes d'épiplasmines.



Suivant l'hypothèse de spéciation, on doit accepter selon la topologie de l'arbre de similarité, que la séparation des espèces a eu lieu bien après la séparation en sous-groupes a et b. Dans l'arbre, les cercles bleus (old duplication) définissent les sommets de cônes de divergence à l'intérieur desquels se séparent les descendants du sous-groupe. Si la vitesse d'évolution des deux ciliés est restée comparable après spéciation, on s'attendrait à ce qu'un orthologue *Tetrahymena* soit contenu dans le cône de divergence issu de la « old duplication » (rond bleu). Ce n'est pas le cas : soit les séquences de *Tetrahymena* ont connu une très forte accélération de leur vitesse d'évolution pour pouvoir expliquer leur divergence actuelle, soit la vitesse d'évolution n'a pas trop varié et le positionnement de l'évènement de spéciation devrait être beaucoup moins récent.

Enfin, on doit considérer que tous les dupliquats du groupe 4 ont été perdus chez *Tetrahymena*, tandis que seul un représentant des autres groupes (1, 2, 3 et 5) était retenu. Cette situation considère que l'ancêtre commun aux deux ciliés avait retenu le premier génome dupliqué. On peut alors supposer que dans certaines cellules de cette lignée, la perte massive de ce génome dupliqué s'est accompagnée de l'évènement de spéciation séparant *Tetrahymena* et *Paramecium*.

Quelle était donc l'organisation de cette cellule ancêtre? Était-elle plus proche d'un *Tetrahymena* ou d'une paramécie. Nous ne pouvons pas répondre à cette question. Par contre, nous pouvons envisager la situation de l'épiplasme.

Chez *Tetrahymena*, le cortex est un territoire continu et on considère les unités corticales comme ouvertes. A l'opposé, le territoire est dit mosaïque chez *Paramecium* à cause de la présence d'unités corticales fermées (se référant à des écailles épiplasmiques séparées par un outer lattice). On a montré que chez la paramécie les épiplasmines du groupe 4 sont localisées en périphérie de l'écaille. Ces épiplasmines délimitent donc le territoire de chaque unité corticale et permettent l'organisation d'un cortex segmenté. Dans l'hypothèse qui nous intéresse ici, on peut suggérer que l'ancêtre commun de la paramécie et de *Tetrahymena* avait un cortex segmenté et que cette segmentation a été perdue chez *Tetrahymena* avec la perte du groupe 4.

Il faut évidemment considérer l'hypothèse selon laquelle la spéciation a eu lieu avant les duplications du génome. Si on suppose une séparation entre *Tetrahymena* et *Paramecium*

avant la première duplication « ancient duplication », on peut imaginer que le groupe 4 n'est apparu que chez la paramécie à l'issue d'évènements de néofonctionnalisation. Donc, dans ce cas, on peut suggérer que l'ancêtre commun des deux ciliés n'avait pas un cortex segmenté et que la segmentation est apparue avec l'apparition du groupe 4 chez la paramécie.

Il faut bien concevoir que les événements génétiques ou génomiques apportant de la néofonctionnalisation sont principalement les événements des duplications massives de génomes entiers ou d'une partie du génome (Hittinger and Carroll 2007). L'histoire du génome de la paramécie, confrontée à celle de *Tetrahymena* montre bien que les événements de duplication du génome ont été les moteurs de l'évolution de ces ciliés. L'explosion de la famille *aurelia* en est l'exemple ! Le positionnement exact de l'événement de spéciation entre ces 2 ciliés est difficile à préciser. Statistiquement, il est plus facile de placer cet événement après la deuxième duplication car celle-ci est encore repérable par l'analyse de synténie et la reconstruction des contigs. Définir ce qu'était le génome antérieurement à la very old duplication est plus délicat et les informations que l'on peut obtenir par reconstruction du génome ancestral sont peu indicatives. On se focalisera donc sur les événements qui suivent la deuxième « old duplication » et qui suffisent à placer la spéciation *Tetrahymena/Paramecium*.

Avec l'analyse de la famille des épiplasmines, l'histoire prend une dimension importante au niveau de la very old duplication. Celle-ci indique un événement sous groupant les épiplasmines et malmenant la topologie du génome avec une perturbation des signaux de régulations. C'est à ce moment là que le nombre des épiplasmines augmente chez *Paramecium* avec probablement sous fonctionnalisation (sous-groupe a et b). Ce premier événement de duplication aurait tout autant favorisé par la suite la spéciation des ciliés. En positionnant plus précocement cette spéciation, on explique mieux la divergence des séquences d'épiplasmines entre *Tetrahymena* et *Paramecium*.

Quoiqu'il en soit de cette histoire, on peut considérer qu'il existe un nombre minimal d'épiplasmines ou un ensemble de type d'épiplasmines. En se référant à une analyse phylogénétique qui se superpose à une analyse structurale, il existerait un épiplasme minimal composé de:

- Petite épiplasmine du groupe 5
- Epiplasmines symétriques du groupe 3
- Epiplasmines symétrique du groupe 1 et leur version asymétrique du groupe 2

A la suite de chaque évènement de duplication, les paralogues sont presque tous conservés traduisant les effets d'une conservation stoéchiométrique de leurs produits dans les groupes 1, 2 et 3. Dans le groupe 5 alors que l'on s'attendrait à dénombrer au moins 12 paralogues, on en dénombre seulement 4. Pourquoi ce groupe de petites épiplasmiques ne suit pas ce qui semble être une règle pour les autres? L'une des explications générales avancée pour expliquer les différences de rétention des paralogues au cours des événements suivant les duplications a été mentionnée par Aury et al., qui suggère que la plus grande rétention des gènes suite à la duplication du génome est due à des contraintes de dosage effet. Ainsi, Les copies peu fréquentes correspondraient à des gènes essentiels ou de régulation pour lesquels la part de sous-fonctionnalisation ou de neo-fonctionnalisation doit être faible afin de ne pas perturber un processus fonctionnel important pour la cellule.

III. Eléments de comparaison avec les filaments intermédiaires

Les petites épiplasmiques du groupe 5 sont donc à étudier avec minutie. Elles représentent probablement une clé importante de la compréhension des épiplasmiques et de leur évolution fonctionnelle. Leur position centrale au sein de l'écaille épiplasmique, peut être au niveau de la plaque terminale en font des protéines accessoires aux corps basaux dont l'étude doit être menée plus précisément. Représentées presque uniquement par le domaine central, ces protéines pourraient être à l'origine de toutes les épiplasmiques dans la mesure où l'on admet un mécanisme de la divergence des épiplasmiques par apparition des domaines N- et C-terminaux modulaires. Cette situation d'un domaine central prépondérant n'est pas sans rappeler l'histoire des filaments intermédiaires. Sans qu'il soit montré une homologie structurale et fonctionnelle entre filaments intermédiaires et épiplasmiques, on peut toutefois constater que le mode d'organisation de ces protéines repose sur un domaine central très conservé auquel les domaines latéraux (tête et queue pour les FI) déterminent la classe. A ce titre, il est postulé que l'histoire évolutive des filaments intermédiaires débute par les lamines, filaments intermédiaires nucléaires, à partir desquels des simples changements de modules latéraux entraîne le foisonnement fonctionnels des filaments intermédiaires cytoplasmiques.

La spécificité cellulaire ou tissulaire des filaments intermédiaires est souvent la conséquence d'une sous fonctionnalisation liée au changement d'un petit nombre d'acides aminés déterminants. L'exemple de la famille de ces protéines du cytosquelette contient donc les pistes de réflexion pour comprendre la diversité des épiplasmiques chez les ciliés. Comment

quelques acides aminés modifient la fonction des protéines? Quelle importance fonctionnelle renferme les modules structuraux visibles sur ces protéines? (ex: domaine Y riche, domaine FLLF pour les épiplasmines, différents coils pour les domaines centraux des FI...). Il est tentant de comparer ces deux systèmes quand simplement on constate :

- Une organisation ancestrale autour d'un domaine central très conservé
- Une variation fonctionnelle par simple modification de modules structuraux courts, voire quelques acides aminés
- Une localisation sous-membranaire
- Une proximité avec les microtubules voire avec des structures centrosomales.

Il serait intéressant de savoir comment se comporteraient des épiplasmines en situation hétérologue par expression dans un organisme pluricellulaire ou des cellules en cultures. Cette expérience n'a pas été tentée en raison d'une limitation technique importante. En effet, le code génétique des ciliés étant biaisé, de nombreux codons stop codent en réalité pour des glutamines. En utilisant à la fois la mutagénèse dirigée et des amorces de grande taille, il serait possible de transfecter des cellules avec des gènes d'épiplasmines corrigés pour une expression en système hétérologue.

Le travail approfondi basé sur l'analyse structurale des épiplasmines apporte beaucoup de questions, de piste de réflexion. La première piste à suivre était donc de réaliser des approches fonctionnelles. Cela a été réalisé par approches RNAi et GFP.

IV. Un modèle constituant l'épiplasme chez la paramécie

L'approche fonctionnelle en utilisant le marqueur GFP montre quatre types de localisation des épiplasmines chez la paramécie. Basé sur ces données, nous proposons un modèle centrifuge pour la constitution d'une écaille épiplasmique avec un épiplasme cinétosomien constitué par les épiplasmines de petite taille du groupe 5 (Epi 51 ou ses représentants structuraux), un épiplasme péricinétosomien représenté par l'Epi 30 ou ses représentants structuraux, un

épiplasme core formé par les épiplasmines symétriques et asymétriques et un épiplasme périphérique constitué des épiplasmines du groupe 4.

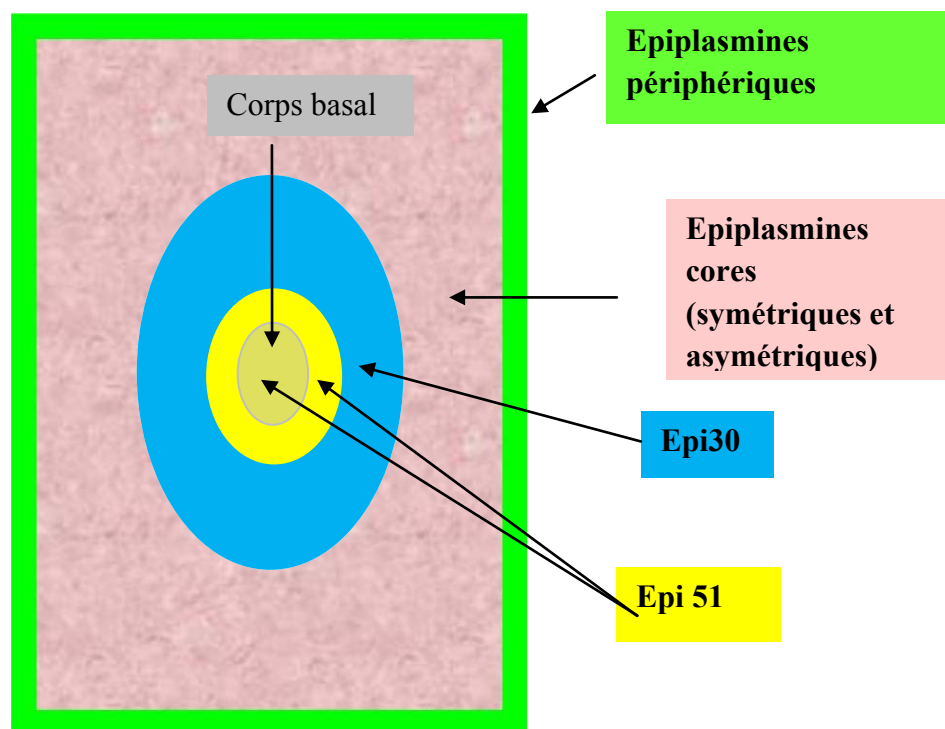
Ce modèle centrifuge correspond au concept selon lequel le corps basal représente le point de départ à la formation de l'unité corticale. Il devient l'organisateur de son territoire. Curieusement, dans ce modèle, on constate que plus les épiplasmines sont de grande tailles, plus elles sont en situation périphérique. Ainsi, les différents modules structuraux générant la variabilité de taille des épiplasmines seraient impliqués dans le positionnement relatif des épiplasmines les unes par rapport aux autres. La présence/absence du domaine FLLF parmi les épiplasmines core aussi bien que dans les épiplasmines de type périphérique ne permet pas d'attribuer à ce domaine un rôle dans la détermination d'une localisation concentrique différentielle des épiplasmines. Il n'est pas évident d'imaginer les types d'interactions des épiplasmines entre elles ni même de modéliser un phénomène qui localiserait les épiplasmines en sorte d'anneau concentrique. Mais force est de constater que c'est bel et bien ce type d'organisation qui règne dans le territoire épiplasmique.

Les petites épiplasmines du groupe 5 sont celles qui établissent les contacts les plus proches avec le corps basal. On serait même tenté de les définir comme superposées à la plaque terminale qui délimite la transition cil/cinétosome. Si les images de microscopie confocale sont d'une grande qualité et d'une grande résolution, la démonstration n'est pas avérée. Il reste à utiliser la résolution ultrastructurale pour déterminer si oui ou non les épiplasmines du groupe 5 (ici Epi 51) sont constitutives des plaques terminales ou internes aux 9 triplets microtubulaires.

Quoiqu'il en soit on peut légitimement considérer que les petites épiplasmines ont une capacité à se localiser à cet endroit de l'édifice ciliaire. Nous supposons donc qu'à minima, le domaine central des épiplasmines renferme la fonction d'interaction avec cette zone du cil. Les domaines latéraux étant plutôt responsables du positionnement des épiplasmines dans l'écaille.

Ce modèle est intéressant dans la mesure où il est compatible avec l'ajout du nouveau matériel épiplasmique par intussusception au cours de l'élongation des écailles lors de la division. Le matériel épiplasmique ne serait donc pas orienté selon le plan d'organisation de la cellule ni même polarisé comme on le montre pour des structures filamenteuses comme les microtubules ou les filaments d'actine.

Ce modèle d'anneau concentrique représenté ci-dessous est également à même d'expliquer le potentiel mécanique et morphogénétique de chaque écaille épiplasmique. En effet une écaille épiplasmique n'est pas une surface plane, c'est plutôt une cupule dont le fond est occupé par le corps basal et le sommet représenté par l'outer lattice. Les parois de cette cupule sont faites des épiplasmines successives organisées en anneaux concentriques. Lorsque l'on observe au microscope une coupe de cellule permettant de voir la courbure de ces cupules, on est surpris de la variété de ces formes. En fonction de la localisation cellulaire, on remarque des territoires épiplasmiques allant de cupules profondes (zone buccale) à des cupules presque plates (extrémité et zone dorsale). Il existe donc une capacité mécanique des territoires épiplasmiques à modifier leur organisation dimensionnelle. Rappelons qu'une paramécie est une cellule de grande taille dont la forme est caractéristique. Cette forme est le résultat d'une information structurale probablement portée par l'ensemble du cortex. Le cortex et donc l'épiplasme sont des matrices morphogénétiques et aussi les supports d'intégration des corps basaux. Ils garantissent le maintien de la forme cellulaire et assurent également les capacités de déformations de la cellule avec retour à l'état normal.



Dans les expériences de RNAi avec les épiplasmiques cores, les cellules présentent la plupart du temps des écailles épiplasmiques extrêmement fragiles et plates. L'altération de certains territoires épiplasmiques concentriques conduit donc à modifier de façon drastique la capacité mécanique de chaque territoire, empêchant alors toute variation dynamique de l'organisation dimensionnelle d'une écaille.

Pour visualiser cette interprétation, nous avons utilisé un objet usuel fabriqué en bambou qui est composé de cercles concentriques de bois (dessous plat et corbeille à fruits en bambou télescopique). Cet objet peut prendre la forme d'une surface plane ou par effet télescopique devenir une forme de cupule.



Ce modèle permet également de comprendre que si l'on altère l'interaction ou l'organisation de ces anneaux concentriques, on altère l'ensemble des fonctions du système. Dans le cas des études d'interférence, il est fréquent d'observer des phénotypes d'écailles plates ou mal organisées. Dans les cas les plus remarquables, les cellules n'ont plus la capacité de se diviser (forme boomerang) et deviennent des amas pluricellulaires. Curieusement, alors que l'on observe des altérations d'organisation du matériel, il existe un grand nombre d'unités pour lesquelles les écailles sont simplement plates. Il y aurait donc 2 effets phénotypiques dose-dépendant du RNAi sur l'écaille. Soit une altération forte engendrant une désorganisation visible de l'écaille, soit une désorganisation moins sévère altérant les capacités de déformation du territoire épiplasmique. Quoiqu'il en soit le résultat final est le même, la

cellule perd sa forme et sa capacité de division. Nous avons touché ici un signal morphogénétique associé à l'état d'organisation local et général de l'épithélium et du cortex.

Ce phénomène est illustratif de la notion de tensegrité qui peut être associée au cytosquelette et au cortex en particulier.

V. Rôle des épiplasmiques.

V.I. L'épiplasme : une structure de tenségrité ?

L'approche RNAi nous a permis d'obtenir un changement de la forme cellulaire, avec l'apparition d'une forme en poire, préalable au phénotype nommé « Boomerang ». Ce phénotype caractérisé par un blocage répété de la cytokinèse, est similaire à celui obtenu dans le mutant *cdaA1* du gène codant pour la protéine p85 chez *Tetrahymena* (Kaczanowska, Buzanska et al. 1992). Cette protéine, impliquée dans l'assemblage des constituants de l'anneau contractile, est exprimée dans le territoire présomptif du sillon de division des cellules parentales (Numata and Gonda 2001). (Kaczanowska, Joachimiak et al. 1999) ont montré que la protéine épiplasmique B, caractéristique de *Tetrahymena*, disparaît transitoirement du territoire présomptif du plan de fission dans les cellules pré-diviseurs. Ces résultats suggèrent que l'épiplasme chez *Tetrahymena* se désassemble localement pour permettre la cytokinèse. Chez la paramécie, comme chez *Tetrahymena*, le sillon de division se développe suite à la mise à disposition de la cellule parentale d'un territoire disponible dans la région équatoriale pour permettre le mécanisme de constriction nécessaire à la séparation des cellules filles (Iftode, Cohen et al. 1989). Ce phénotype « Boomerang » est observé dans le cas du RNAi de l'actine 4 chez la paramécie (Sehring, Reiner et al. 2007). Cette protéine reste associée au sillon de division depuis le premier stade de division jusqu'à la fin de la fission. Ce résultat est en accord avec un rôle indirect des épiplasmiques dans la cytokinèse via l'élongation de la cellule parentale et une modification locale du cortex dans sa région médiane nécessaire à la mise en place d'un anneau contractile. Une question reste à traiter est la nature biochimique exacte des protéines impliquées dans la constriction des cellules parentales chez la paramécie.

D'autre part, chez les ciliés, le traitement de la paramécie par un inhibiteur de la phosphorylation, le 6-diméthylaminopurine, empêche le désassemblage du réseau infraciliaire et provoque l'arrêt de la cytokinèse (Kaczanowska, Iftode et al. 1995) et les défauts de morphogénèse sont corrélés avec des défauts dans le désassemblage de ce réseau.

Kaczanowska, Iftode et al. 1995 ont montré que ce réseau infraciliaire et les structures corticales superficielles représentent un modèle de tenségrité pour la morphogénèse durant la cytokinèse chez la paramécie.

Chez les métazoaires, les lamines constituent un modèle de tenségrité. Ce modèle explique l'implication des lamines dans les fonctions du noyau. Les différentes lamines (A, B, C) constituent un cytosquelette sous-membranaire. Elles interagissent entre elles *in vivo* pour former des complexes hétérotypiques, ce qui veut dire qu'il y a des espèces moléculaires différentes qui coopèrent pour aboutir à une fonction commune. La perte d'une des lamines peut causer des effets secondaires sur les autres lamines et sur des fonctions du noyau. Par analogie, il est donc envisageable que les épiplasmiques qui ont des séquences différentes mais similaires, interagissent pour former des complexes hétérotypiques et la perte d'une de ces épiplasmiques pourrait causer des effets secondaires pour les autres épiplasmiques altérant ainsi la structure épiplasmique et ensuite la cytokinèse.

Si l'on considère les milliers d'unités corticales, leur interrelation par l'épiplasma définit un « réseau » capable par le jeu de l'équilibre des tensions de ces constituants, de supporter l'énergie mécanique liée aux mouvements de la cellule provoqués par des événements externes (pression) ou internes (mouvements des organelles, division). L'altération dimensionnelle des cupules épiplasmiques est avérée quand on touche à la structure épiplasmique majoritaire (épiplasmiques cores) (à l'exception des épiplasmiques des groupes 4 et 5). Suite au mécanisme d'ARN interférence, ce réseau perd cet équilibre induisant l'altération générale de la forme cellulaire puis le blocage de la cytokinèse. Manifestement cette altération de la tenségrité semble liée à la perte d'une organisation 'valide' des épiplasmiques cores, finalement les épiplasmiques les plus nombreuses. Finalement le concept de tenségrité permet d'illustrer et d'interpréter les processus de morphogénèse aussi bien chez les métazoaires que chez les ciliés.

Les expériences de RNAi sur les épiplasmiques périphériques entraînent un ralentissement du processus de division de l'écaille épiplasmique, sans effet apparent sur son élongation préalable. Ce processus de division est tardif au regard de la vie d'une unité (de son cycle). Dans ce cas, les capacités mécaniques et morphogénétiques des écailles ne sont pas touchées. La tenségrité ou l'équilibre général du cortex n'est pas altéré, les cellules sont normales. L'élongation générale de la cellule permet l'élongation des écailles épiplasmiques. Le seul problème à ce niveau de la division de l'écaille réside dans le fait qu'il y a peu de nouvelles

épiplasmiques périphériques qui sont ajoutées à la structure. On assiste donc simplement à un ralentissement de la division sans perturbation. Il faut toutefois mentionner pour plus de clarté que le processus d'interférence n'est jamais total. Dans le cas de *Paramecium* et considérant la redondance fonctionnelle des isoformes d'épiplasmiques, la cellule continue à produire des épiplasmiques périphériques. La division cellulaire proprement dite, soit la scission des cellules sœur n'est possible qu'à partir d'un certain seuil de division des écailles épiplasmiques.

Dans les 2 cas que nous venons de discuter il apparaît que l'épiplasma est bien une matrice morphogénétique. De son état dépend :

- la forme de la cellule et sa conservation
- la réussite de division du cortex et la réussite de division de la cellule

Par la mise en relation de chaque unité corticale, on définit une structure épiplasmique globale à l'échelle de la cellule, qui peut alors développer les effets de tenségrité. Un tel maillage dimensionnel est illustré par l'outer lattice. D'abord mis en évidence à l'aide d'anticorps hétérologues (Cohen et al. 1987), il est facilement mis en évidence par l'anticorps monoclonal issu d'une fusion après injection de cortex de *Paramecium*. Toutefois cet anticorps n'est pas réactif en western blot et aucune protéine n'a jamais été caractérisée. Les images obtenues par la localisation des épiplasmiques périphériques peuvent permettre de visualiser un réseau de type outer lattice. A ce stade de l'analyse on peut s'autoriser à penser que les épiplasmiques périphériques sont les composants de l'outer lattice. Celui-ci pourrait en fait être la somme des épiplasmiques périphériques dont le rôle serait à la fois de délimiter chaque écaille épiplasmique et d'en faire les liens.

Les épiplasmiques périphériques permettraient donc de définir, outre les limites de chaque unité corticale, la cohésion fonctionnelle de toutes les unités corticales vers les fonctions de matrice morphogénétique préalablement exposée.

V.II. Cas des épiplasmiques chez *Tetrahymena*

On doit à ce stade de la discussion se poser la question de la situation de l'épiplasma chez *Tetrahymena*. Nous n'avons pas réalisé la localisation des épiplasmiques chez ce cilié. La seule information disponible concerne l'étude des protéines majeures de l'épiplasma: Bandes A, B et C (EpC) (Williams, 1984 et 1995, Bouchard, 1998 et 2001). Les informations moléculaires et structurales simplement disponibles pour EpC ne montrent pour l'instant aucune relation

avec les épiplasmiques de *Paramecium*. Deux anticorps monoclonaux, l'un décrit par Williams 1987, et l'autre décrit au laboratoire montre l'existence d'un matériel pericinétosomien qui pourrait lier l'épiplasma aux édifices microtubulaires. Une telle situation correspond aux localisations fréquentes des épiplasmiques chez *Paramecium*. Si l'on considère que les 4 épiplasmiques trouvées chez *Tetrahymena* ont des localisations similaires à celles observées avec leurs analogues structuraux chez *Paramecium*, alors le modèle d'organisation centrifuge est applicable. Il reflète l'origine commune de ce type de molécules et leur fonction essentielle dans la mise en place d'une unité corticale. Chez *Tetrahymena*, le caractère ouvert de l'unité corticale est corrélé avec l'absence d'épiplasmiques périphériques ou d'un maillage de type outer lattice. La cohésion fonctionnelle des unités corticales doit pourtant être assurée. Les protéines majeures de l'épiplasma, notamment EpC sont des protéines dont la distribution est homogène dans toute la cellule excepté au point d'ancrage des cinéosomes. Cette distribution pourrait indiquer une fonction de lien des unités corticales permettant la cohésion de l'ensemble du territoire épiplasmique.

Il faudra donc localiser les quatre séquences Epi T identifiées chez *Tetrahymena* et étudier leur rôle.

VI. Vers un modèle de bipartition de l'écaille épiplasmique

La distinction structurale des épiplasmines symétriques et asymétriques est basée sur la présence d'un domaine original situé en C-terminal des épiplasmines asymétriques. La caractéristique que l'on retiendra de ce domaine est un court motif hydrophobe riche en phénylalanine. Ce motif en représentation HCA est de type FLLF. Nous l'utilisons pour dénommer ce domaine. Ce domaine n'est pas réservé aux épiplasmines asymétriques puisque qu'on le retrouve dans le groupe 4, dit des épiplasmines atypiques, c'est-à-dire sans géométrie définie. Sa fonction mérite donc d'être étudiée en détail. Il peut permettre une interaction particulière des protéines avec leurs voisines épiplasmiques. On peut également suggérer une interaction avec un partenaire important de l'épiplasma qui n'est autre que la membrane.

Les épiplasmines symétriques ou asymétriques des groupes 1 et 2 sont localisées de manière homogène dans l'écaille. Probablement majoritaires, elles composent l'épiplasma core dont l'altération produit des phénotypes drastiques pour la cellule. Dans les nombreuses images générées par les expériences de localisation des épiplasmines core, nous avons pu observer des situations (non montré) où on pourrait envisager l'hypothèse d'un épiplasma organisé en 2 couches. Ces situations sont issues de superposition d'image de double marquage. Une première image concerne la localisation grâce au tag GFP d'une épiplasmine core, la seconde grâce à l'anticorps CTS32. Bien que nous soyons proches de la limite de résolution physique du microscope confocal, il apparaît des situations où les deux marquages ne se confondent pas. Cela indiquerait 2 territoires épiplasmiques très proches. A ce stade de l'exploration technique, il n'est ici question que de spéculation. La finesse de la couche d'épiplasma ne laisse pas approcher facilement cette théorie. Toutefois cette situation avait déjà été évoquée lors des travaux de caractérisation biochimique et immunologique entrepris par Nahon et al 1993. Dans ce travail, on peut en effet observer par immunocytochimie ultrastructurale des marquages qui semblaient définir des épitopes superficiels à l'épiplasma.

On peut donc imaginer qu'il existe un épiplasma formé de deux couches putatives : l'une plutôt membranaire, l'autre plutôt cytoplasmique suggérant une interaction spécifique avec les autres composants corticaux.

Nous avons schématisé ce modèle d'épiplasme avec deux partitions éventuelles dans la figure ci-dessous.

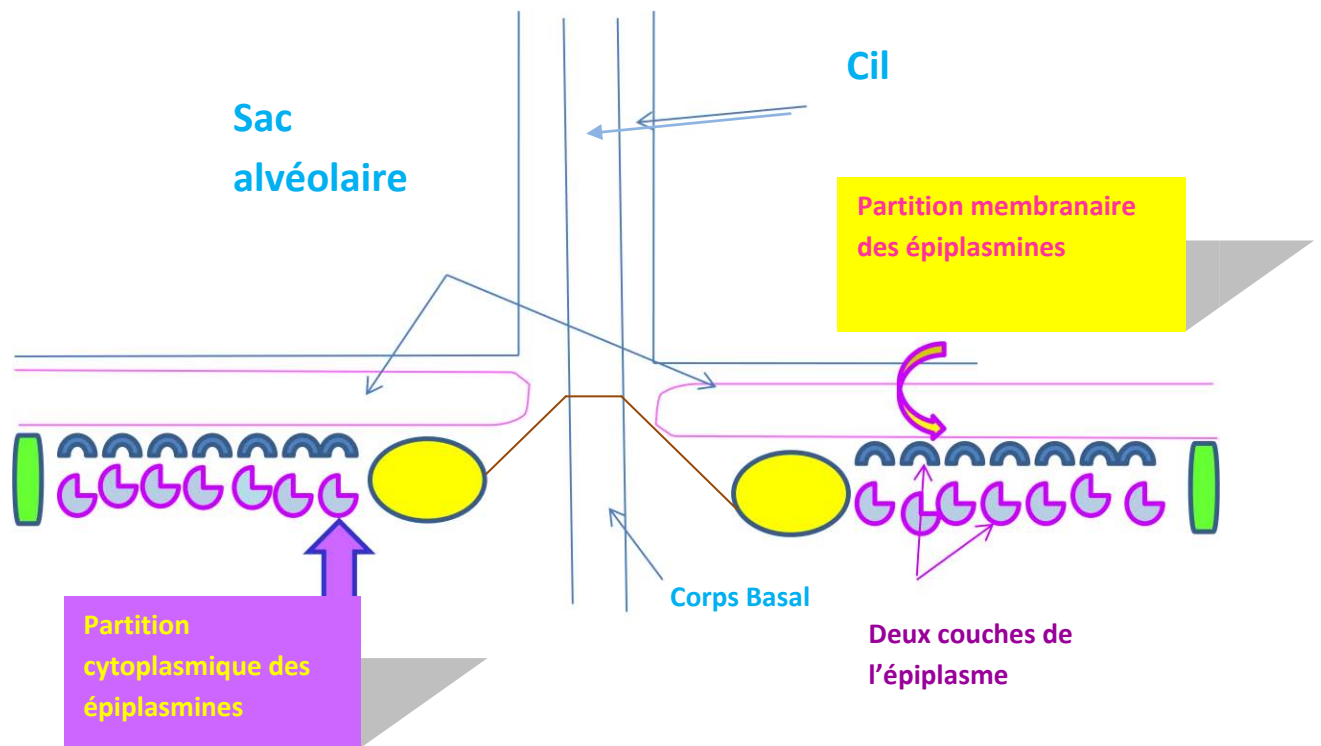


Schéma représentant le modèle proposé pour la structure bipartite de l'épiplasme.

Il n'est pas novateur dans ce travail de déclarer que l'épiplasme entretient des liens étroits avec la membrane (alvéolaire interne). La proximité de la membrane est une réalité pour toute l'écaille épiplasmique. Dans le cadre de notre hypothèse, nous expliquons pourquoi les épiplasmiques périphériques possèdent des représentants avec présence ou absence du domaine FLLF.

Cependant, ce domaine est totalement absent des épiplasmiques du groupe 3 et 5 dont la localisation est très proche du cinétosome (péricinétosomienne) soit probablement

cinétosomienne. Dans la topographie du cil, la région d'association cinétosome épiplasme semble plus indépendante de la membrane. On considèrera les épiplasmines du groupe 3 et 5 comme les épiplasmines de liaison entre la zone terminale du cinétosome (plaque terminale ?) et l'épiplasme core.

VII. Element de liaison : cinétosome/épiplasme

Il est donc ici question de ce qui permet de lier un corps basal avec l'épiplasme. L'hypothèse minimale réside dans les capacités de liaisons des épiplasmines des groupes 3 et 5. Cependant une nouvelle famille de protéines en cours de caractérisation au laboratoire apporterait d'autres éléments de réponse.

Une famille de 4 protéines est en cours d'étude. Ces protéines ont été identifiées sur la base de leur parenté structurale avec les articulines, protéines décrites comme épiplasmiques chez les flagellés euglénien (Marrs, 1992) et certaines ciliés (peck, 1991 ; Huttenlauch, 1995)

La localisation de ces protéines appelée Pcar (protein containing articuline repeat) est véritablement péricinétosomienne. Cette localisation a été réalisée par expression de protéine chimère couplée à la GFP. Les observations ont été faites en microscopie confocale et par immunocytochimie ultrastructurale. Ces images sont présentées en annexe.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus sur la localisation différentielle des épiplasmines des groupes 3 et 5 et celle des Pcar, il est important de considérer que ces nouveaux types de protéines jouent un rôle essentiel et fondamental dans la liaison corps basal/épiplasme. Finalement, la perspective majeure de ce travail réside désormais dans la dissection des mécanismes mettant en relation le corps basal avec son environnement.

VIII. Reconsidérations techniques

Dans ce travail qui constitue une première approche fonctionnelle des épiplasmines et eu égard au grand nombre de séquences de cette famille, un choix technique a été fait de placer le marqueur GFP du côté C-terminal des toutes les séquences d'épiplasmines. Ce choix tient compte de la probabilité pour un bon repliement de la chaîne polypeptidique, et donc une meilleure fonctionnalité des épiplasmines chimères. Cependant dans le cas des épiplasmines où

la géométrie est un probable critère de sélection fonctionnelle, on peut se demander si ce choix général a été le meilleur. Si l'on prend pour exemple une épiplasmine asymétrique, l'adjonction d'une séquence GFP en aval pourrait masquer le domaine FLLF et modifier leur fonctionnalité. Dans les cas décrits de ce travail, la présence de la GFP n'altère pas la localisation épiplasmique des protéines. Mais on peut évoquer une altération de la localisation différentielle de ces protéines.

Il faudrait donc envisager de réétudier la localisation des épiplasmines en insérant la GFP dans la partie N-terminale de la protéine ou même centrale. On pourrait également utiliser des étiquettes qui perturberaient moins la structure des protéines comme des épitopes polyhistidine.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes :

A- Cultures cellulaires :

La souche sauvage de *Paramecium tetraurelia* 8-2B, est cultivée à 28°C dans le milieu WGP (Wheat Grass Powder, Pines International, Lawrence, KA) infecté par la bactérie *Klebsiella pneumoniae*. Avant l'utilisation, 0,4 µg/ml de β sitostérol sont ajoutés au milieu, comme décrit par (Sonneborn 1970).

B- Analyse des séquences nucléiques et protéiques

Les séquences nucléiques des épiplasmies sont alignées en utilisant le programme CLUSTALW (v1.8) disponible sur le site <http://clustalw.genome.jp>, et traitées par le logiciel « Phylip 3.6 package » (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) pour construire un arbre de similarité, les distances sont calculées par DNADIST en utilisant le modèle F84. Les arbres sont élaborés par le programme FITCH utilisant la méthode de Fitch-Margoliah. Les intervalles de confiance sont évalués en utilisant 1000 répliques et 10 tirages pour chaque réplique. L'arbre a été dessiné avec le logiciel Treeview v1.66, disponible sur le site <http://taxonomy.zoology.gla.uk/rod.html>. L'analyse par la méthode HCA « Hydrophobic Cluster Analysis » des épiplasmies a été effectuée selon le travail de (Callebaut et al. 1997). Les représentations graphiques sont obtenues sur le site http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS/cgi-bin/Ressource.cgi?chzn_lg=fr&chzn_rsrc=HCA. La méthode GCA « Generalized Cluster Analysis » a été utilisée pour discriminer les différents domaines structuraux selon leur susceptibilité de former des boucles ou des hélices alpha, comme décrit par (Eudes et al. 2007).

C- Clonage des ADN et séquençage

Les séquences sont amplifiées par PCR sur l'ADN génomique en utilisant des amorces spécifiques : Les produits d'amplification ont été clonés dans le plasmide litmus 28i (New England Biolabs) possédant 2 sites T7 comme le plasmide L4400 et transformés dans les bactéries HT115 compétentes utilisées pour le mécanisme d'ARN interférence médié par le feeding (Timmons et al. 2001). Les inserts introduits dans les plasmides sont séquencés

sur les deux brins en utilisant des amorces spécifiques du litmus et en utilisant le Kit « DTCS Quick Start » (Beckman Coulter, France).

D- Le RNAi médié par le feeding

Les expériences de Feeding ont été réalisées comme décrit par (Galvani and Sperling 2002). Les *P. tetraurelia* témoins sont nourries avec des bactéries HT115 transformées par le litmus seul.

E- Microscopie

Les cellules sont perméabilisées 1 minute en utilisant un tampon PHEM (Pipes 60mM, Hepes 25mM pH 6,9, EGTA 10mM, MgCl₂ 2mM) contenant 1% de Triton X-100, puis fixées 1 heure en PHEM contenant 2% de paraformaldéhyde. Les cellules sont lavées avec du PBS (0,15 M de NaCl, 10 mM de Na₂HPO₄, PH 7,2) et sont incubées pendant 15 minutes dans du PBS contenant 3% de BSA pour empêcher des liaisons non spécifiques des anticorps. L'anticorps primaire, CTS32 (Nahon et al. 1993) dilué 1/20 dans du PBS contenant 1% de BSA (PBSB) est appliqué 1 heure. Les lames sont lavées dans du PBS et traitées une heure avec un anticorps secondaire conjugué anti-mouse IgG FITC (GAM-FITC, Sigma) dilué au 1/100 dans du PBSB. Après trois lavages successifs dans du PBS, les cellules sont montées dans du Vectashield (Vector laboratories). Les phénotypes induits par le mécanisme d'ARN interférence sont observés en utilisant un microscope à épifluorescence « DMCR epifluorescence Leica » équipé par une caméra CCD « Cohu high performance ».

F- GFP et Injections

Les injections ont été réalisées au laboratoire de Biologie Cellulaire 4 à Orsay. Les cellules injectées sont post autogames (c'est à dire ayant fait environ 5 divisions après l'autogamie) pour éviter qu'elles ne repassent l'autogamie après l'injection. La souche utilisée est le mutant nd7 exocytose négatif. Les cellules sont rincées en Dryl additionné de BSA (0,2%) ce qui les protège lors des manipulations. Elles sont immobilisées sous huile et la microinjection est faite avec un système de micromanipulation monté sur un microscope inversé. La plupart des injections sont réalisées par co-injection avec un plasmide réparant la mutation nd7. Après injection, les cellules sont clonées et mises à 20° environ. Après 3 divisions environ (on a donc à peu près 8 cellules), on teste l'efficacité de l'injection en testant la capacité d'exocytose sur 3-4 cellules par clone. Les clones qui exocytent sont conservés et on attend que les

cellules se divisent 1 ou 2 fois avant de tester en fluorescence sur le vivant en compressant entre lame et lamelle. Les clones choisis (plus ou moins fluorescents si possible pour avoir différentes conditions) sont fixés (soit perméabilisation/fixation, soit fixation), rincés en PBS BSA puis l'on regarde la fluorescence de la GFP en direct. Pour une étude plus approfondie, on réalise un double marquage avec un anti-GFP pour amplifier le signal et l'anti-épiplasme CTS32 pour marquer les écailles.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Adoutte A., Fleury A.** (1996). Cytoskeleton of ciliates. *Ciliates: cells as organisms*; 41-49.
- Allen R.D.** (1967). Fine structure, reconstruction and possible functions of components of the cortex of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*; **14**: 553-565.
- Allen R.D.** (1969). The morphogenesis of basal bodies and accessory structures of the cortex of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*; **40**: 716-733.
- Allen R.D.** (1971). Fine structure of membranous and microfibrillar systems in the cortex of *Paramecium caudatum*. *J. Cell Biol.*; **49(1)**: 1-20.
- Allen R.D., Fokt A.K., Kwang W.J.** (2000). Membrane trafficking and processing in *Paramecium*. *International Review of Cytology*. Academic Press; pp 277.
- Aury J.M.** (2006). Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*; **444**: page 171.
- Barbie M. Machiels FCSRHJHKJSGJWOLHJL.** (1997). Nuclear lamin expression in normal testis and testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *The Journal of Pathology*; **182(2)**: 197-204.
- Beisson J., Jerka-Dziadosz M.** (1999). Polarities of the centriolar structure: Morphogenetic consequences. *Biology of the Cell*; **91(4-5)**: 367-378.
- Beisson J., Clerot J-C, Fleury-Aubusson A., de Loubresse N.G., Ruiz F., Klotz C.** (2001). Basal Body-Associated Nucleation Center for the Centrin-Based Cortical Cytoskeletal Network in *Paramecium*. *Protist.*; **152(4)**: 339.
- Bossie C.A., Sanders M.M.** (1993). A cDNA from *Drosophila melanogaster* encodes a lamin C-like intermediate filament protein. *J. Cell Sci.*; **104(4)**: 1263-1272.
- Bouchard P., Viguès B., Ruchaud M.H., Ravet V.** (1998). The membrane skeleton of *Tetrahymena* contains immunoanalogs of GFAP, the intermediate filament protein expressed in astrocytes and cells of glial origin. *European Journal of protistology*; **34(2)**: 138-147.
- Bouchard P., Chomilier J., Ravet V., Mornon J.P., Viguès B.** (2001). Molecular characterization of the major membrane skeletal protein in the ciliate *Tetrahymena pyriformis* suggests n-plication of an early evolutionary intermediate filament protein subdomain. *J. Cell Sci.*; **114(1)**: 101-110.

- Bricheux G., Brugerolle G.** (1986). The membrane cytoskeleton complex of euglenids .1. Biochemical and immunological characterization of the epiplasmic proteins of euglena acus. *European journal of cell biology*; **40(2)**: 150-159.
- Broers JLV, Hutchison C.J., Ramaekers FCS** (2004). Laminopathies. *Journal of Pathology*; **204(4)**: 478-488.
- Burke B., Stewart C.L.** (2002). Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; **3(8)**: 575.
- Callebaut I., Labesse G., Durand P., Poupon A., Canard L., Chomilier J., Henrissat B., Mornon J.P.** (1997). Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (hca): current status and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* ; **53(8)**: 621-645.
- Cenni V., Sabatelli P., Mattioli E., Marmioli S., Capanni C., Ognibene A., Squarzoni S., Maraldi N.M., Bonne G., Columbaro M., Merlini L., Lattanzi G.** (2005). Lamin A N-terminal phosphorylation is associated with myoblast activation: impairment in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Med Genet.*; **42(3)**: 214-220.
- Chang L., Goldman R.D.** (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5(8)**:601-613.**Cohen J., Beisson J.** (1988). The cytoskeleton *Paramecium* (HDGortz ed); 363-392.
- Chen B., Cai S.T., Zai Z.H.** (1994). Investigation of nuclear lamina in *Tetrahymena thermophila*. *journal of experimental biology*, **27(2)**: 153-163.
- Coffe G., LeCaer J.P., Lima O., Adoutte A.** (1996). Purification, in vitro reassembly, and preliminary sequence analysis of epiplasmins, the major constituent of the membrane skeleton of *Paramecium*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*; **34(2)**: 137-151.
- Cohen J., Garreau de Loubresse N., Beisson J.** (1984). Actin Microfilaments in *Paramecium*: Localization and role in intracellular movements. *Cell Motil.*; **4**: 443-468.
- Cohen J., Deloubresse N.G., Klotz C., Ruiz F., Bordes N., Sandoz D., Bornens M., Beisson J.** (1987). Organization and dynamics of a cortical fibrous network of *paramecium* - the outer lattice. *Cell Motility and the Cytoskeleton*; **7(4)**: 315-324.
- Cohen J., Beisson J.** (1988). The cytoskeleton *Paramecium* (HDGortz ed); 363-392.
- Cohen M., Lee K.K., Wilson K.L., Gruenbaum Y.** (2001). Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. *Trends Bioc. Sci.*; **26**: 41-47.

Curtenaz S., Peck R.K. (1992.) A monoclonal-antibody study of protein distribution in the membrane skeleton of the ciliate *Pseudomicrothorax*. *Journal of cell science*; **103**: 1117-1125.

Curtenaz S., Nahon P., Iftode F., Fleury A. (1994). Interspecific immunological cross-reactions among cortical proteins of 4 ciliates. *European Journal of protistology*; **30(4)**: 440-450.

Deloubresse N.G., Klotz C., Viguès B., Rutin J., Beisson J. (1991). Ca^{2+} binding proteins and contractility of the infraciliary lattice in *Paramecium*. *Biology of the Cell*; **71(1-2)**: 217-225.

Deloubresse N.G., Keryer G., Vigues B., Beisson J. (1988). A contractile cytoskeletal network of paramecium - the infra ciliary lattice. *Biology of the Cell*; **63(2)**: 259-259.

Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J. (2003) Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol Rev.*; **83(2)**: 433-473.

Dupuis-Williams P., Fleury-Aubusson A., de Loubresse N.G., Geoffroy H., Vayssie L., Galvani A., Espigat A., Rossier J. (2002). Functional role of γ -tubulin in the assembly of the centriolar microtubule scaffold. *J Cell Biol.*; **158(7)**: 1183-1193.

Dutcher S.K. (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Current Opinion in Microbiology*; **6(6)**: 634-640.

Eisen J.A., Coyne R.S., Wu M., Wu D., Thiagarajan M., Wortman J.R., Badger J.H., Ren Q., Amedeo P., Jones K.M., Tallon L.J., Delcher A.L., Salzberg S.L., Silva J.C., Haas B.J., Majoros W.H., Farzad M., Carlton J.M., Smith R.K., Garg J., Pearlman R.E., Karrer K.M., Sun L., Manning G., Elde N.C., Turkewitz A.P., Asai D.J., Wilkes D.E., Wang Y., Cai H., Collins K., Stewart B.A., Lee S.R., Wilamowska K., Weinberg Z., Ruzzo W.L., Wloga D., Gaertig J., Frankel J., Tsao C-C, Gorovsky M.A., Keeling P.J., Waller R.F., Patron N.J., Cherry J.M., Stover N.A., Krieger C.J., del Toro C., Ryder H.F., Williamson S.C., Barbeau R.A., Hamilton E.P., Orias E. (2006). Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote. *PLoS Biology*; **4(9)**: e286.

Eudes R., Le Tuan K., Delettre J., Mornon J-P, Callebaut I. (2007). A generalized analysis of hydrophobic and loop clusters within globular protein sequences. *BMC Structural Biology*; **7(1)**: 2.

Fisher D.Z., Chaudhary N., Blobel G. (1986). cDNA Sequencing of Nuclear Lamins A and C Reveals Primary and Secondary Structural Homology to Intermediate Filament Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; **83(17)**: 6450-6454.

Fuchs E., Weber K. (1994). Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. Annual Review of Biochemistry; **63(1)**: 345-382.

Furukawa K., Inagaki H., Hotta Y. (1994). Identification and Cloning of an mRNA Coding for a Germ Cell-Specific A-Type Lamin in Mice. Experimental Cell Research; **212(2)**: 426.

Galvani A., Sperling L. (2002). RNA interference by feeding in *Paramecium*. Trends in Genetics; **18(1)**: 11.

Garnier O., Serrano V., Duharcourt S., Meyer E. (2004). RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. Mol Cell Biol.; **24(17)**: 7370-7379.

Georgatos S.D., Maroulakou I., Blobel G. (1989). Lamin A, lamin B, and lamin B receptor analogues in yeast. J Cell Biol.; **108(6)**: 2069-2082.

Guerra C., Wada Y., Leick V., Bell A., Satir P. (2003). Cloning, localization, and axonemal function of Tetrahymena centrin. Molecular Biology of the Cell; **14(1)**: 251-261.

Gogendeau D., Keller A-M, Yanagi A., Cohen J., Koll F. (2005). Nd6p, a Novel Protein with RCC1-Like Domains Involved in Exocytosis in *Paramecium tetraurelia*. Eukaryotic Cell; **4(12)**: 2129-2139.

Gogendeau D. (2007). Functional diversification of centrins and cell morphological complexity. J.Cell.Sci.; **121**: 65.

Gonda K., Yoshida A., Oami K., Takahashi M. (2004). Centrin is essential for the activity of the ciliary reversal-coupled voltage-gated Ca²⁺ channels. Biochemical and Biophysical Research Communications; **323(3)**: 891.

Gruenbaum Y., Landesman Y., Drees B., Bare J.W., Saumweber H., Paddy M.R., Sedat J.W., Smith D.E., Benton B.M., Fisher P.A. (1988). Drosophila nuclear lamin precursor Dm0 is translated from either of two developmentally regulated mRNA species apparently encoded by a single gene [published erratum appears in J Cell Biol 1988 Jun; 106(6):2225]. J Cell Biol.; **106(3)**: 585-596.

Hakes L., Pinney J., Lovell S., Oliver S., Robertson D. (2007). All duplicates are not equal: the difference between small-scale and genome duplication. Genome Biology; **8(10)**: R209.

Harborth J., Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl T., Weber K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. J.Cell Sci.; **114(24)**: 4557-4565.

Hauser K., Haynes W.J., Kung C., Plattner H., Kissmehl R. (2000). Expression of the green fluorescent protein in *Paramecium tetraurelia*. European journal of cell biology; **79(2)**: 144-149.

Haynes, W.J., K.Y.Ling, Y.Saimi, C.Kung (1995). Induction of antibiotic resistance in *Paramecium tetraurelia* by the bacterial gene APH-3'-II. J.Eucaryot. Microbiol.; **42**: 83-91.

Hausmann K., Hulsmann N. (1996). Protozoology 2nd ed Georg thieme Verlag, stuttgart.

Herrmann H., Aebi U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. Current Opinion in Cell Biology; **12(1)**: 79.

Hirono M., Nakamura M., Tsunemoto M., Yasuda T., Ohba H., Numata O., Watanabe Y. (1987). *Tetrahymena* actin - localization and possible biological roles of actin in *tetrahymena* cells. Journal of Biochemistry; **102(3)**: 537-545.

Hittinger C.T., Carroll S.B. (2007). Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. Nature; **449(7163)**: 677.

Hutchison C.J. (2002). Lamins: building blocks or regulators of gene expression? Nat. Rev. Mol. Cell Biol.; **3(11)**: 848.

Hutchison C.J., Worman H.J. (2004). A-type lamins: Guardians of the soma? Nat. Cell Biol.; **6(11)**: 1062.

Huttenlauch I., Peck R.K. (1991). The membrane skeleton of *pseudomicrothorax*. 2. Biochemical and immunological characterization of the glycosylated cytoskeletal proteins. Journal of cell science; **100**: 707-715.

Huttenlauch I., Geisler N., Plessmann U., Peck R.K., Weber K., Stick R. (1995). Major Epiplasmic proteins of ciliates are articulins: cloning, recombinant expression, and structural characterization. J. Cell Biol.; **130(6)**: 1401-1412.

Huttenlauch I., Peck R.K., Plessmann U., Weber K., Stick R. (1998). Characterisation of two articulins, the major epiplasmic proteins comprising the membrane skeleton of the ciliate *Pseudomicrothorax*. J. Cell Sci.; **111(14)**: 1909-1919.

Huttenlauch I., Peck R.K., Stick R. (1998b). Articulins and epiplasmins: two distinct classes of cytoskeletal proteins of the membrane skeleton in protists. Journal of cell science; **111**: 3367-3378.

Huttenlauch I., Stick R. (2003). Occurrence of articulins and epiplasmins in protists. Journal of Eukaryotic Microbiology; **50(1)**: 15-18.

Iftode F., Cohen J., Ruiz F., Rueda A.T., Chen-Shan L., Adoutte A., Beisson J. (1989). Development of surface pattern during division in *Paramecium*. I. Mapping of duplication and reorganization of cortical cytoskeletal structures in the wild type. *Development*; **105(2)**: 191-211.

Iftode F., Fleury-Aubusson A. (2003). Structural inheritance in *Paramecium*: ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biol. Cell*; **95(1)**: 39-51.

Jeanmairewolf R., Clerot J.C., Nahon P., Iftode F., Fleury A., Adoutte A. (1993). Isolation and characterization of monoclonal-antibodies to cytoskeletal and membrane-proteins of the *paramecium* cortex. *European Journal of protistology*; **29(3)**: 311-333.

Kaczanowska, J., L. Buzanska, et al. (1992). "The influence of fission line expression on the number and positioning of oral primordia in the *cdaa1* mutant of *tetrahymena-thermophila*." *Developmental Genetics*; **13(3)**: 216-222.

Kaczanowska, J., F. Iftode, et al. (1995). "Tensegrity model of pattern formation during cytokinesis of a ciliate, *Paramecium*: Effects of an inhibitor of phosphorylation, 6-dimethylaminopurine, and of an adenine." *Journal of Experimental Zoology*; **273(6)**: 494-510.

Kaczanowska, J., E. Joachimiak, et al. (1999). "Molecular Subdivision of the Cortex of Dividing *Tetrahymena* Is Coupled with the Formation of the Fission Zone." *Developmental Biology*; **212(1)**: 150-164.

Keryer G., Adoutte A., S.F. N, Cohen J., Garreau de Loubresse N., Rossignol M., Stelly N., Beisson J. (1990). Purification of the surface membrane cytoskeleton complex (cortex) of *Paramecium* and identification of several of its protein constituents. *Eur. J. Protistol.*; **25**: 209-225.

Kloetzel J.A. (1991). Identification and properties of plateins, major proteins in the cortical alveolar plates of euplotes. *Journal of Protozoology*; **38(4)**: 392-401.

Kloetzel J.A., Baroin-Tourancheau A., Miceli C., Barchetta S., Farmer J., Banerjee D., Fleury-Aubusson A. (2003a). Cytoskeletal proteins with N-terminal signal peptides: plateins in the ciliate *Euplotes* define a new family of articulins. *J. Cell Sci.*; **116(7)**: 1291-1303.

Kloetzel J.A., Baroin-Tourancheau A., Miceli C., Barchetta S., Farmer J., Banerjee D., Fleury-Aubusson A. (2003). Plateins: A Novel Family of Signal Peptide-Containing Articulins in *Euplotid* Ciliates¹. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*; **50(1)**: 19-33.

Klotz C., Bordes N., Laine M.C., Sandoz D., Bornens M. (1986). Myosin at the apical pole of ciliated epithelial cells as revealed by a monoclonal antibody. *J. Cell Biol.*; **103(2)**: 613-619.

Lammerding J., Schulze P., Takahashi T., Kozlov S., Sullivan T., Kamm R., Stewart C., Lee R. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction, *J. Clin Invest.*; **113(3)**: 370-378.

Lammerding J., Hsiao J., Schulze P.C., Kozlov S., Stewart C.L., Lee R.T. (2005). Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol.*; **170(5)**: 781-791.

Lammerding J., Fong L.G., Ji J.Y., Reue K., Stewart C.L., Young S.G., Lee R.T. (2006) Lamins A and C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics. *J. Biol. Chem.*; **281(35)**: 25768-25780.

Lang S., Loidl P. (1993). Identification of proteins immunologically related to vertebrate lamins in the nuclear matrix of the myxomycete *Physarum polycephalum*. *European journal of cell biology*; **61(1)**: 177-183.

Liang A.H., Ruiz F., Heckmann K., Klotz C., Tollon Y., Beisson J., Wright M.(1996). Gamma-tubulin is permanently associated with basal bodies in ciliates. *European journal of cell biology*; **70(4)**: 331-338.

Liu J., Ben-Shahar T.R., Riemer D., Treinin M., Spann P., Weber K., Fire A., Gruenbaum Y.(2000). Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Molecular Biology of the Cell*; **11(11)**: 3937-3947.

Madeddu L., Klotz C., LeCaer J.P., Beisson J. (1996). Characterization of centrin genes in *Paramecium*. *European Journal of Biochemistry*; **238(1)**: 121-128.

Maeshima K., Yahata K., Sasaki Y., Nakatomi R., Tachibana T., Hashikawa T., Imamoto F., Imamoto N. (2006). Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *J Cell Sci.*; **119(21)**: 4442-4451.

Marrs J.A., Bouck G.B. (1992). The two major membrane skeletal proteins (articulins) of *Euglena gracilis* define a novel class of cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.*; **118(6)**: 1465-1475.

Maul G., Deaven L., Freed J., Campbell G., Beçak W. (1980). Investigation of the determinants of nuclear pore number. *Cytogenet. Cell Genet.*; **26(2-4)**: 175-190.

Méténier G. (1984). Actin in *Tetrahymena paravorax*: Ultrastructural localization of HMM-binding filaments in glycerinated cells. *J. Protozool.*; **3** : 205-215.

M.anguet A., Franca S., Moreno Díaz De La Espina S. (1994). Dinoflagellates have a eukaryotic nuclear matrix with lamin-like proteins and topoisomerase II. *Journal of cell science*; **107(10)**: 2861-2873.

Nahon P., Coffe G., Leguyader H., Darmanadendelorme J., Jeanmairewolf R., Clerot J.C., Adoutte A. (1993). Identification of the epiplasmins, a new set of cortical proteins of the membrane cytoskeleton in *Paramecium*. *Journal of cell science*; **104**: 975-990.

Newport J.W., Wilson K.L., Dunphy W.G. (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol.*; **111(6)**: 2247-2259.

Numata, O. and K. Gonda (2001). "Determination of division plane and organization of contractile ring in *Tetrahymena*." *Cell Structure and Function*; **26(6)**: 593-601.

Peck R.K., Duborge I. F., Huttenlauch I.R.M., De Haller G. (1991). The Membrane Skeleton of Pseudomicrothorax: I. Isolation, Structure and Composition. *J. Cell Sci.*; **100(4)**: 693-706.

Peck R.K. (1977). The ultrastructure of the somatic cortex of *Pseudomicrothorax dubius*: structure and function of the epiplasm in ciliated protozoa. *J. Cell Sci.*; **25(1)**: 367-385.

Plattner H., Kissmehl R., Kwang W.J. (2003). Molecular Aspects of Membrane Trafficking in *Paramecium*. *International Review of Cytology*. Academic Press; pp 185.

Pomel S., Diogon M., Bouchard P., Pradel L., Ravet V., Coffe G., Vignes B. (2006). The membrane skeleton in *Paramecium*: Molecular characterization of a novel epiplasmin family and preliminary GFP expression results. *Protist.*; **157(1)**: 61-75.

Riemer D., Dodemont H., Weber K. (1993). A nuclear lamin of the nematode *Caenorhabditis elegans* with unusual structural features; cDNA cloning and gene organization. *Eur J. Cell Biol.*; **62(2)**: 214-223.

Ruiz F., Garreau de Loubresse N., Beisson J. (1987). A mutation affecting basal body duplication and cell shape in *Paramecium* [published erratum appears in *J Cell Biol* 1987 Jun; 104(6):1755]. *J. Cell Biol.*; **104(3)**: 417-430.

Ruiz F., Vayssie L., Klotz C., Sperling L., Madeddu L. (1998). Homology-dependent Gene Silencing in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell*; **9(4)**: 931-943.

Ruiz F., Beisson J., Rossier J., Dupuis-Williams P. (1999). Basal body duplication in *Paramecium* requires γ -tubulin. *Current Biology*; **9(1)**: 43.

Ruiz F., Krzywicka A., Klotz C., Keller A.M., Cohen J., Koll F., Balavoine G., Beisson J. (2000). The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, [eta]-tubulin. *Current Biology* ; **10(22)**: 1451-1454.

Ruiz F., Garreau de Loubresse N., Klotz C., Beisson J., Koll F. (2005). Centrin Deficiency in *Paramecium* Affects the Geometry of Basal-Body Duplication. *Current Biology*; **15(23)**: 2097.

Sehring I.M., Reiner C., Mansfeld J., Plattner H., Kissmehl R. (2007). A broad spectrum of actin paralogs in *Paramecium tetraurelia* cells display differential localization and function. *J. Cell Sci.*; **120(1)**: 177-190.

Shang Y., Li B., Gorovsky M.A. (2002). *Tetrahymena thermophila* contains a conventional {gamma}-tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *J. Cell Biol.*; **158(7)**: 1195-1206.

Sonneborn T.M. (1970). Methods in *Paramecium* research. *Meth Cell Physiol.*; **4**: 241-339.

Sonneborn T.M. (1974) [Ciliate morphogenesis and its bearing on general cellular morphogenesis]. *Tsitologia*; **16(9)**: 1063-1088.

Spann T.P., Moir R.D., Goldman A.E., Stick R., Goldman R.D. (1997). Disruption of Nuclear Lamin Organization Alters the Distribution of Replication Factors and Inhibits DNA Synthesis. *J. Cell Biol.*; **136(6)**:1201-1212.

Stadelmann B., Khandjian E., Hirt A., Luthy A., Weil R., Wagner H.P. (1990). Repression of nuclear lamin A and C gene expression in human acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia Research*; **14(9)**: 815.

Stemm-Wolf A.J., Morgan G., Giddings T.H., Jr., White E.A., Marchione R., McDonald H.B., Winey M. (2005). Basal Body Duplication and Maintenance Require One Member of the *Tetrahymena thermophila* Centrin Gene Family. *Mol. Biol. Cell*; **16(8)**: 3606-3619.

Stierle V., Couprie J., Ostlund C., Krimm I., Zinn-Justin S., Hossenlopp P., Worman H.J., Courvalin J.C., Duband-Goulet I. (2003). The Carboxyl-Terminal Region Common to Lamins A and C Contains a DNA Binding Domain. *Biochemistry*; **42(17)**: 4819-4828.

Sullivan T., Escalante-Alcalde D., Bhatt H., Anver M., Bhat N., Nagashima K., Stewart C.L., Burke B. (1999). Loss of A-type Lamin Expression Compromises Nuclear Envelope Integrity Leading to Muscular Dystrophy. *J. Cell Biol.*; **147(5)**: 913-920.

Timmons L., Court D.L., Fire A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*; **263(1-2)**: 103-112.

Timmons L., Fire A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* ; **395(6705)**: 854-854.

Vaudaux P. (1976). Isolation and identification of specific cortical proteins in *Tetrahymena-pyriiformis*. strain gl. *Journal of Protozoology*; **23(3)**: 458-464.

Vaudaux P.E., Williams N.E. (1979). Cytoskeleton proteins of the cell-surface in *Tetrahymena*. 2. Turnover of major proteins. *Experimental Cell Research*; **123(2)**: 321-331.

Vayssie L., Sperling L., Madeddu L. (1997). Characterization of multigene families in the micronuclear genome of *Paramecium tetraurelia* reveals a germline specific sequence in an intron of a centrin gene. *Nucleic Acids Research*; **25(5)**:1036-1041.

Venables R., McLean S., Luny D., et al. (2001). Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *British journal of cancer*; **84(4)**:512-519.

Vergnes L., Peterfy M., Bergo M.O., Young S.G., Reue K. (2004). Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; **101(28)**:10428-10433.

Viguès B., Méténier G., Grolière C.A., Grain J., Sénaud J. (1985). Biochemical study of proteins of cortical cytoskeleton in the ciliate *Isotricha prostoma*. *J. Protozool.*; **32(1)**:38-44.

Williams N.E., Buhse H.E., Smith M.G. (1984). Protein similarities in the genus *Tetrahymena* and a description of *Tetrahymena-leucophrys* n-sp. *Journal of Protozoology*; **31(2)**:313-321.

Williams N.E., Honts J.E., Lu Q., Olson C.L., Moore K.C. (1989). Identification and localization of major cortical proteins in the ciliated protozoan, euplotes-eurystomus. *Journal of cell science*; **92**, 433-439.

Williams N.E. (1991). A comparison of alveolar plate proteins in 2 species of euplotes. *European Journal of protistology*; **27(1)**:21-25.

Williams N.E., Honts J.E., Jaeckelwilliams R.F. (1987). Regional differentiation of the membrane skeleton in *Tetrahymena*. *Journal of cell science*; **87**: 457-463.

Williams N.E., Honts J.E., Dress V.M., Nelsen E.M., Frankel J. (1995). Monoclonal-antibodies reveal complex structure in the membrane skeleton of *Tetrahymena*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*; **42(4)**:422-427.

Wong P., Coulombe P.A. (2003). Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair. *J. Cell Biol.*; **163(2)**:327-337.

Annexes

Annexes

MILIEU WGP

Le milieu se prépare à partir de deux solutions mères concentrées 20X : Herbe et Tampon.

10 ml Herbe 20x

50ml Tampon 20x

H₂O qsp 1l

Autoclaver, inoculer la veille de l'utilisation avec *Klebsiella pneumoniae*, et compléter le jour même avec 200 µl de β-sitostérol (solution à 4 mg/ml dans EtOH, Merck, art. 3471) par litre de milieu.

Herbe 20x :

Pour un litre, peser 100g de Wheat Grass Powder (Pines International, PO Box 1107, Lawrence, KS 66044, USA). Faire bouillir 20 minutes dans un peu moins d'1 litre d'eau, filtrer 3 fois sur gaze + filtre (préfiltre Millipore, Glass Fibre Cat n° AP2512450), ajuster à un litre, autoclaver.

Tampon 20x:

15 g TRIS base

14.9 g Na₂HPO₄, 2H₂O

4 g NaH₂PO₄

H₂O qsp 1l- Ajuster à pH 7.0 avec HCL (à peu près 9.5 ml)

TECHNIQUE DE FEEDING CHEZ LA PARAMECIE

I. Matériels :

LBAT et LBT en boîtes et milieux liquides
IPTG à 50mg/ml
WGP (milieu pour paramécies)
Ampicilline à 100 mg/ml
Tétracycline
 β -sitostérol

II. Protocole :

- 1) *Jour 1* : - Etaler les bactéries sur LBAT (toujours partir d'une culture fraîche).
- 2) *Jour 2* : - Inoculer 10 ml de LBAT et incuber une nuit à 37°C.
- 3) *Jour 3* : - Induire la culture en ajoutant 25 μ l d'IPTG à 50 mg/ml et, incuber 2 à 4 heures à 37°C.
 - Centrifuger 10 min à 40°C à 3000 rpm.
 - Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans :

10ml WGP
15 μ l β -sitostérol
10 μ l ampicilline
12 μ l tétracycline
25 μ l IPTG

- On obtient une solution 20x
- Ramener la solution à 2x :

200 μ l de solution à 20x
3 μ l de β -sitostérol
2 μ l ampicilline
2.4 μ l tétracycline
5 μ l IPTG
Qsp 2ml WGP

- 2) Faire jeuner et laver dans du Volvic + CaCl₂ 1mM ou dans du Dryl.
- 3) Donner 300 μ l à environ 10 paramécies.
- 4) Répéter les étapes 2 et 3 pour nourrir les paramécies sur plusieurs jours.
- 5) Observation des phénotypes au bout de 24 heures.

Numéros d'accès aux gènes d'épiplasmies dans la banque génomique de la paramécie et leurs séquences protéiques :

>GSPATP00021018001 EPI 1
MSNIPQSSQQAQQAPQAPQPPYQGQPSYAQPYGAPLSPLRYSYAPPVVQQVVPQTYVPQQVIPQTYVPQQVVA
QPVVAQPVVAQSVVAQPTIKGESRIEYVPYEKTVLEYEEVRQRIQVPREKYVTDYYAVEYQTEYVPQVFQE
KFTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQQVQQVVAQPVQQVVTQSVVQPVQYAPQPVQYAPQPVQYVQQPV
QYAPQPVQYAPAPLQQTSTYVPAPVASLPLAQTQIPTRTVPQARPQQPLDRTQAQNPRPNPQAPQQPQQKQK
SFLDRLFDRD*

>GSPATP00022926001 EPI 2
MSNIPQSQHPQQAQQPPQAPQPPYQGQPSYAQPYGAPLSPLRYSYAPPVVQQVVPQTYVPQQVVPQTYVPQQ
VVAQPVVAQPVVAQSVVAQPTIKGESRIEYVPYEKTVLEYEEVRQRIQVPREKFVTDYYAVEYQTEYVPQV
FQEKFTYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQQQVQQVVAQPVQQVVTQSVVQPVQYAPQPVQYVQQPVQYAP
QPVQYASQPVQYAPAPLQQTSTYVPAPVASLPLAQTQVPTRTVPQARPQQPLDRTQAQNPRPQPAQQPQQKQ
KSFLDRLFDRD*

>GSPATP00018381001 EPI 3
MANIPQQQYSTPSNLPSYNRDQSTYQQPTLGQQQVQPSNYQPPQSSAEKGLQYLPQQQGILPQNVQTQPLYG
QPQVGIVGQPFQTQQPIFGQSQIQQLPQQTVETQQGQVVKGQSRIEYIPYERTITEYEEVRRQVQVPITKQV
TDYYAVQYDIEYIPQVIEKQVEYVPVERVAERTEYTTVERQNVIIQQPVGYQSSQVQTSYAPVQTQQFTQQ
YTQYVPPQQTIAYQQPVQIQQQYQTREVIHQPIVQQSYLQOREVIPQQQVQVQQSVALOPTIPTTQYLPQQ
QYQTQPLQIAQTVPPLNYGQQIQTIQTQQQPIVNPATQPTTQINQGYSPVTQTQAPQYSVYGQQSLGPQQ
PKTQQPLAQTQYNPQLQQTVAQAQFAQSVPQQQQQQQQQQQQQSIQDMGRTRPYQQGQLPQQPSQPQQA
GTAQKQNKESFLEKLF*

>GSPATP00018839001 EPI 4
MANLPQQQYSTPSNLPSYNRDPSTYQQPTLGQQQIPQSNYQPPQSSDKGLQYLPQQIGGLPQNAQPPQQQL
YGQPPQFGLIGQPITQQPVFGQSQIQQLPQTETQQGQLVKGQSRIEYIPYERTITEYEEVRRQVQVPITK
QITDYYAVQYDIEYIPQVIEKQIEYVPVERVAERTEYTTVERQNVIIQQPIGYQSSQVQTSATYTPVQTQL
LSQQYAQYVQPPQTLAYQQPVQVQQQYQTREVIQQPIAQSSYVQQREVVPQQQIQQSVALOPTLPTTQYVP
QQQYQTQNTQTVQPLQIAQTVPPLNYGQSIAQQPVNPAIQTNAPVNQGYSPATQVNQGYSPATQVNQ
GYSIPSTQQPVYGGQSLGPQQPKTQQPLTQTTQYNPQLQQTVAQPSQFAQSVPQQQQQQQSIQDMGRTRPYQ
QAPLPQQPSQPQQAGTAQKSNKEKSFLEKLF*

>GSPATP00010399001 EPI 5
MSNHPASQRPPQPVQNAHQPVAYSPPRTYAPPVQFASPSYYPVQQSVVAPVQYVPQPVAVQPLVQPVAVQ
PVAVQPAQQVIKGESRIEYIPYEKSVIEYEEVRQRIQVPREKYVTEYQAVEYQTEYIPQVFYDKVTEYVPV
DRFQDRVEYYPVERQVVHQQQVVAQPVVQPVVQSVVQVQVQYVAPVPQYVAPVAQPYVAQSYVQPSYVQPS
YVPSRVAPVYNHAPYQGRPVSPRRFSPPSKPVQIQKQPQEKKKTFLENIFS*

>GSPATP00037619001 EPI 6
MSNHPSQRPPQPVQNAHQPLAYSPRTYAPPVQFASPSYYPVQQSVVAPVQYVPQPVAVQPIVQPVAVQ
PAQQVIKGESRIEYIPYEKSVIEYEEVRQRIQVPREKYVTEYQAVEYQTEYIPQVFYDKVTEYVPVDRFQD
RVEYYPVERQVVHQQQVVAQPVVQSVVQVQVQYVAPVPQYVSPVAQPYVAQSYVQPSYVPSRVAPVYNHAP
YQGRPVSPRRFSPPSKPVQIQKQPQEKKKTFLENIFS*

>GSPATP00033449001 EPI 7
MSFYPGYRYPYAAPLTSSFAAPLTYPQVSYAPPVQYAPQVSYAPPVSYAAPVQYARPVTSYVQPVLLQSS
VIAQPVVAQPVQQPIKGESRVEYREYQRPVEMETETVQVQVPKTKYVTDYYPVEYQTEYIPRTVYEQQTE
YVPVTKTVPRVEYEAFAREVQRAQPVVQPVVQSVVQVQVQVQPLSYSLVRPAPTYAAPVAYSSVAPVGA
YPSYYGGYRYP*

>GSPATP00008953001 EPI 8
MSQLPQQGQESKPHSNLPQQNIPQGGQNPQIFPQAQPPYVVAQNLRAPISGFPAQQQLPY
SQQQGLQPLPQSQIQGQTGAPYQTGPVQLSSHVLTQAIKGESRIEYVPYERVITEYEEVRRQVQVPITRQ
ITDYYAVQYEIEYIPQVIEKQIEYVPVERIQERTEYTTVQKQNILPAQTNLAQSQTQIQTRVQQQIVTQQ
AQYVTVAAQQPQVTTYQAPPIQTQVLQPPPVQPPITSTFIQPPITTTLQRPNVVQNTIIPQTQLASTYVQ
QQPTIIPGQVQSIPQTIQTTSVVPQTIQTGSIQVQTRTSLKPPTTIIQPQATIPQASIPLATTTALPVQLA
QTAVPSSVYKDFQRLPAQGNLSYRKTLPPIQPGQLAQTAPPIQVPTQPPQPQKQAKQDKDKTFLELFE*

>GSPATP00025293001 EPI 9

PVVQQPVQYVQQPVQVVQPQPVQVYQQPIVQQPLVQSIPVQTVRPPVGPVYAPTTTLPLGQTVSPRHGPAP
VTAKPLDKTQGNQPAQQQNKPKSFLDRLFDRD*
>GSPATP00011787001 EPI 20
MSNVPNSHHPPQAPKQGPYQPTQFQPGFAPQYAPAPVTYGPPLTSSPLRYSQPLYQPSVVAQPVYAPPVV
QQPVYAPSVVQQPVVTQSVVAQPVVAAQPIKGESRIEYVPYEKTVLEYEEVRQKIQVPRERYVTDYYAVEY
QTEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQPAQQVQQVVAQPVVQQPVQVVQQPVQYVQQPVV
QQPLVQSIPVQTVRPPVYAPGSLPLGQTVSPRLPPQAQTKPQAQLPQTKQPQQQKTKSFLDRLFDRD*
>GSPATP00005649001 EPI 21
MSNVPNSEQHPPQAPQQGAPYQPNHFQPGFAPQYAPAPVAYGPPLTSSPLRYSQPLYQPSVVAQPVYAPQVV
QQPVLCSTSCLTTSCHSIFVAQPVVAAQPIKGESRIEYVPYEKTVLEYEEVRQKIQVPRERYVTDYYAVEY
QTEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQVQPVVQQPVQVVQQPVSLSNQSNMFNNQSSN
NLWFNQSQSRLFVHQFMLQDHYLQAKLYHQDYPLKLPNLPVNHKHNKNNHNNNRNQRAFTDYSTEIDMD
YFIKINISNQILNFLDSSIHKLISPFNKIILQ*
>GSPATP00026586001 EPI 22
MSQRPPVPQNQAPQPPQYPSAPQYAPQYAPQYVPPQYAPLPTYLPQQYAPAPIAPLTYSVARPVAPQPVVAQ
PVVQAPVLQQSVIAQPVVQQSVHATIKGESRIEYIPYQKAVMEYEEQEVVQYVPREKKITDYYAVEYQTEY
IPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQVQPVVQQPVVQQVVPQPVVQQVQVQPLSVV
QPQVQTVPVTYAPQYAAPIVSSRVIPSYPQYPSYPQYQQAPQQQAQPPQPPRSNLNVH*
>GSPATP00023977001 EPI 23
MLRIYKQNNQKSFFFNVPKTTCPIKLSPLTIIILTSSNICSIICTTICSNIRPCLCPYLCPNICSIICSCS
YCTTNIQCCCKTCCSTQPVIAQPVVAQPVVQQSVHATIKGESRIEYIPYQKAVMEYEEQEVV
QYVPRERKVTDYYAVEYQTEYVPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQVQPVVQQVQVQPV
VQVQVQPVVQQVVPQPVVQQVQVQPLSVVQPQVQTVPLTYAPQYAAPIVSSRVIPSYPQYPSYPQYQQAPQ
QHQAQPPQPPRSNLNVH*
>GSPATP00012673001 EPI 24
MPIYPTAPLTSSIPAPVSVVQPVSYAQPVTYAQPVQYVPPQPVQYVPPQPVVQQPVIAQPILTQSV
VAAPQQAPIKGESRVEYREFQRPVEMETETIQVQVPKTKYVTDYYPVEYQTEYIPRTVYEQQTEYVPVTK
TVPRVEYDAVEREVQRVQYQPVQTVPVQPVFNPMFNQSNHSLIQLLDQQPKLQSMNLNQLLQHSLIQVLDQ
LMPQFIQVILKLVLHDHNKHNQCLQTNHNEIILYHKHLYRIINFIIKLKFFFSNSKINSILKNSYSIEFY
QLYSYVLYIFGDILCILIQLIFLQK*
>GSPATP00013326001 EPI 25
MPIYPTAPLTSSIPAPVSVVQPVSYAQPVTYAQPVSYVPPQPVQYVPPQPVVQQPVIAQPILTQSVVAAPQQA
PIKGESRVEYREFQRPVEMETETIQVQVPKTKYVTDYYPVEYQTEYIPRTVYEQQTEYVPVTKTVPRVEY
DAVEREVQRVQYQPVQTVPVQPVVQSVIQPVQPLTYSVARPIAQAPVYAQPVVAPALTFSGVRPAYAPVYP
SYPPVGARTQQPQQPVPSNKPQ*
>GSPATP00006591001 EPI 26
MSFYPGFYFPQYTQPLAASFAAPLAYPQASIVRPVATAPIYTAAPAPIYTAAPVVTQSVVQPVVQSVVQPVV
AAQPAIKGESRVEYREYQRPVVEYETETIEVKKPVTKYVTDYYPVEYQTDYIPRTVYETQTEYVPVQKTVP
RVEYEAVEREVQRVPAAPVQYAPAPLTYSVVQPVQSVVTQPVAAQYTTPLTYSTVRPAYGYPPYY*
>GSPATP00002128001 EPI 27
MSFYPGFYFPQYTQPLAASFAAPLAYPQASIVRPVATTPIYTAAPAPIYTAAPVVTQSVVQPVVQSVVQPVV
AAQPAIKGESRVEYREYQRPVVEYETETIEVKKPVTKYVTDYYPVEYQTDYIPRTVYETQTEYVPVQKTIP
RGLKSSCCPLQYAPAPLTYSVVQPVQPVVTQPVASYGTPLTYSTVRPAYGGYPYY*
>GSPATP00013569001 EPI 28
MSNRPEAAQQPQQPQQRQVPAQTRPAGPVYPNTYLPPTYYPASPIRQSYVAPVAPIQYAPVAQVPVAPI
ASVPIQQVAPVPVQTLGVAPVAQHQTIKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQTE
YIPQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQPAQAVSVVQQPVIQQSVQYVQQPVQYVQQPVQYVQ
QPLIASRVVPQFVQPYAAPVVRPSQPQQQSHQPQQVPSQQPRPQAVQQQQSQQQ*
>GSPATP00016851001 EPI 29
MSNHPQAAQQPQQAPAPVPQAQQRPAAPVYPNAYLPPTYYPASPIRQSYVAPVAPIQYAPVAQVPVAPIAS
VPVQQALAPVQVQPVAVAPVAQHQTIKGESRIEYIPYQKAVVEYEEQEIVSYVPRETKVTDYYAVEYQTEYI
PQVFQEKYTEYVPVDRYQERVEYYPVERQVVHQPTQYVQQAVSVVQQPVIQQSVQYVQQPVQYVQQPVQY
AQQPVQYVQQPVQYAAQPLIASRVVPQFVQPYAAAPVARTSQPQQQSHQPQQVPSQQPRSQATQQQAQQ
QQ*
>GSPATP00001502001 EPI 30
MYSYAPLGVSYASPLATSIARPVPVGYAAPVSYAAPVSYAPPISYAAPVSYAAPQYSPIRGESRVEYVPYQ
KPVVELEEEVRTFQVPKQKQVTDYYPVEYQKEYVPQVSYEKQIDYVPVEKNVPRVDYLEYEREVRRAPPAP
VSYASPLSYSYVAPVAPLRTSVVAPTNYGYGYAPTYSYAAPTFTGYGSVYRY*

Amorces pour cloner les épiplasmines dans le vecteur litmus (RNAi) :

Ep18D-xbaI : 5' GCG GCG TCT AGA ATG AGC AAC ATT CCA CCC TCT CAA C 3'

Ep18R-xbaI : 5' GCG GCG TCT AGA TCA ATC TCT GTC AAA TAA TCT ATC 3'

Ep25D-EcoRI : 5' GCG GCG GAA TTC ATG CCT ATC TAC CCA ACA GCA CC 3'

Ep25R-EcoRI : 5' GCG GCG GAA TTC TCA TTA TGG TTT ATT GGA TGG 3'

EP51D-xbaI : 5' GCG GCG TCT AGA ATG TCA TAC TAC AAA CCC TTT TAC 3'

Ep51R-xbaI : 5' GCG GCG TCT AGA TCA AAG GTA TCT GTA GCC GTA GCC 3'

EP7D_XbaI: 5'GCG GCG TCT AGA ATG TCC TTT TAT CCT GGC TAC 3'

EP7R_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGATCAATAAGGTCTATATCCAC 3'

EP11D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGAACAATCCTCGTCCATC 3'

EP11R_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGATCATGCGTACTTAGGACTC 3'

EP20D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGAGCAACGTACCCAATTC 3'

EP20R_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGATCAATCTCTGTCTGAATAATC 3'

EP23D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGTCCCAAAGACCACCTGTCC 3'

EP23R_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGATCAATGAACATTCAAATTTG 3'

EP30D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGTACTCATATGCTCCATTAG 3'

EP30R_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGATCAATATCTGTAAACTGATC 3'

EP34D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGAGCAATCACCTGCATC 3'

EP34R_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGATCAACTAAAGATGTTGTC 3'

EP38D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGTCCAATAGACCACCC 3'

EP38R_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGATCATTTTTAAGGTGTTTG 3'

EP40D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGGCCAACCTACCTCCC 3'

EP40R_XbaI: 5' GCGGCGTCTAGATCAATCGAATAATTTTTTC 3'

EP48D_XbaI: 5'GCGGCGTCTAGAATGAGTTATCTCTATTCACC 3'

EP48R_XbaI: 5' GCGGCGTCTAGATCAATAATAATATCTGGATG 3'

Amorces pour cloner les épiplasmies dans le vecteur pPXV-eGFP:

Ep18S-SpeI: 5' GCG GCG ACT AGT ATG AGC AAC ATT CCA CCC TCT CAA CAC CCA CCC 3'

Ep18AS-xhoI: 5' GCG GCG CTC GAG TTC CAT CTC TGT CAA ATA ATC TAT CCA A AA AGC 3'

Ep25S-SpeI: 5' GCG GCG ACT AGT ATG CCT ATC TAC CCA ACA GCA CCT CTT ACC AGT TC 3'

Ep25AS-xhoI: 5' GCG GCG CTC GAG TTC CTT ATG GTT TAT TGG ATG GCA CTG GTT ATT ATG 3'

Ep51S-SpeI: 5' GCG GCG ACT AGT ATG TCA TAC TAC AAA CCC TTT TAC CAA AGT GCC 3'

Ep51AS-xhoI: 5' GCG GCG CTC GAG TTC CAA GGT ATC TGT AGC CGT AGC CCG TTG CTC C 3'

EP11S_speI: 5' GCGGCGACTAGTATGAACAATCCTCGTCCATC 3'

EP11AS_xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGATGCGTACTTAGGACTCTATC 3'

EP20S_speI: 5' GCGGCGACTAGTATGAGCAACGTACCCAATTC 3'

EP20AS_xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGAATCTCTGTCTGAATAATCTGTC 3'

EP23S_speI: 5' GCGGCGACTAGTATGTCCCAAAGACCACCTGTCC 3'

EP23AS_xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGAATGAACATTCAAATTTGATC 3'

EP30S_speI: 5' GCGGCGACTAGTATGTACTCATATGCTCCATTAG 3'

EP30AS_xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGAATATCTGTAAACTGATCCATAAC 3'

EP34S_speI: 5'GCGGCGACTAGTATGAGCAATCACCTGCATC 3'

EP34AS_xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGAACTAAAGATGTTGTCTAAAAATG 3'

EP38S_speI: 5' GCGGCGACTAGTATGTCCAATAGACCACCC 3'

EP38AS_xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGATTTTTTAAGGTGTTTGTAG 3'

EP40S_speI: 5' GCGGCGACTAGTATGGCCAACTTACCTCCC 3'

EP40AS_xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGAATCGAATAATTTTCTAAAAATG 3'

EP48S-speI: 5'GCGGCGACTAGTATGAGTTATCTCTATTCACC 3'

EP48AS-xhoI: 5' GCGGCGCTCGAGAATAATAATATCTGGATGG 3'

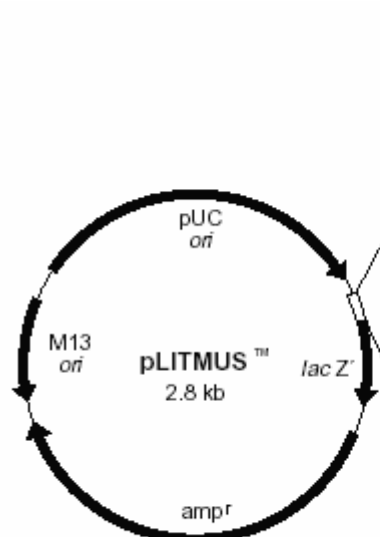
EpiTetra2-xhoI: 5' GCG GCG CTC GAG CTC GAA GAT TCT TTC AAG GAA AG 3'

EpiTetra2-speI: 5' GCG GCG ACT AGT ATG TCT GAC CAA CCT GAA CAA GC 3'

Séquence et carte du vecteur litmus 28i

GTAACTACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTC
AAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGT
ATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGC
TGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTCTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCG
CGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTT
GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAA
CCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC
GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTC
TAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCT
TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGG
GGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC
TTTAGATTGATTTACCCCGGTTGATAATCAGAAAAGCCCCAAAAACAGGAAGATTGTATAAGCAAATATTTAA
ATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCC
GAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACA
AGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACT
ACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGG
AGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCG
GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGC
TACAGGGCGCGTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAA
TCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTT
TTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCA
CCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTG
GCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA
TGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGA
GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACT
TGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTAA
CGGTTTCTGGCCTTTTGTGCGCCTTTTGCTCACATGTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAAGGCTTT
ACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGA**AACAGCTAT**
GACCATGATTACGCCAAGCTACG**TAATACGACTCACTATAG**GGC**AGATCTTCGAATGCATCGCGCGCACC**
GTACGTCTCGAGGAATTCCTGCAAGGATATCTGGATCCACGAAGCTTCCCATGGTGACGTCACCGGTTCT
AGATACCTAGGTGAGCTCTGGTACCCTCTAGTCAAGGCCTATAGTGAAGTCTGATTACGG**ACTGGCCGTCGT**
TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCC
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGC
GCTTCGCTTGTAATAAAGCCCGCTTCGGCGGGCTTTTTTTT

Litmus forward



LITMUS 28i	LITMUS 38i
T7↓	T7↓
Bgl II	(Apa I) – Psp0M I
(Nsi I) – Ppu 10 I	Mfe I
BssH II	Ngo M IV
Bsi W I	Kas I
Xho I	Hind III
EcoR I	(Pst I)
(Pst I)	EcoR V
EcoR V	BamH I
BamH I	EcoR I
Hind III	Nhe I
Nco I	Eag I
(Aat II)	Mlu I
Age I	Bsp E I
Xba I	Bsr G I
Avr II	(Sph I)
(Sac I)	Sal I – Acc I
(Kpn I) – Acc65 I	Stu I
Stu I	
T7↑	T7↑

T7 promoteur

MCS

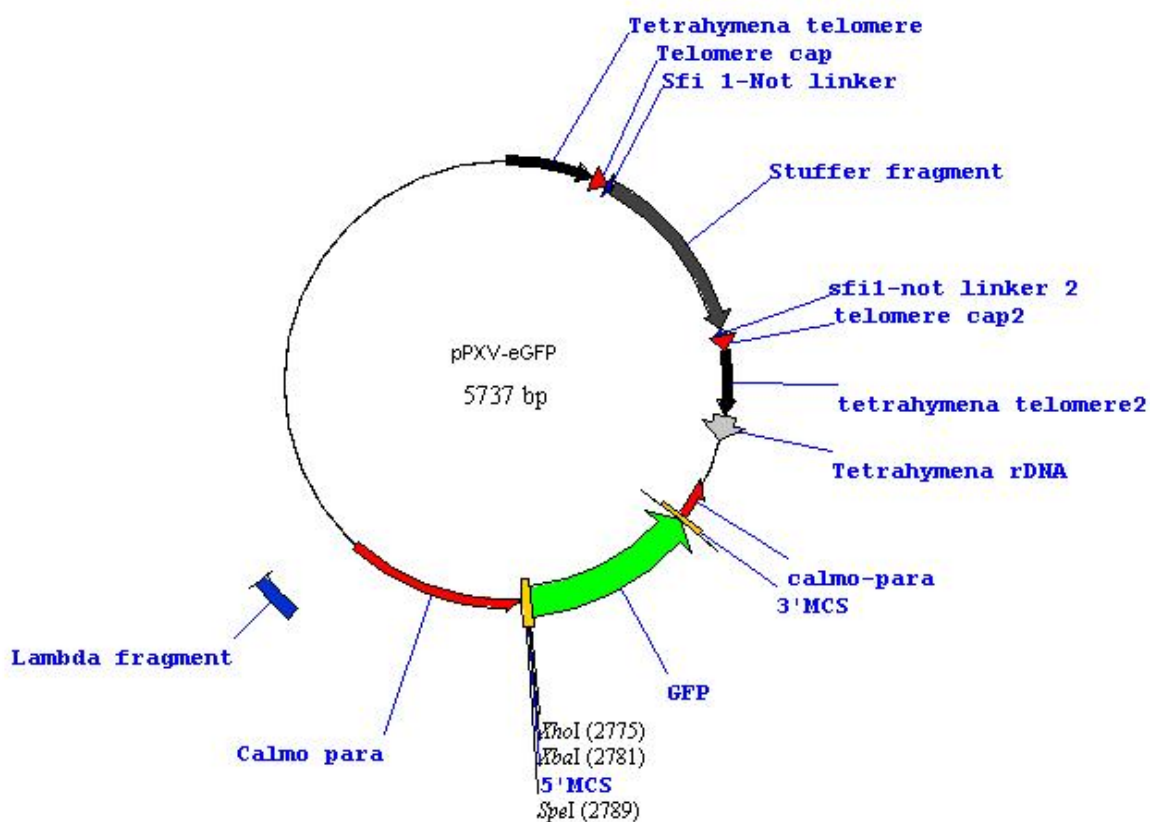
primer Reverse

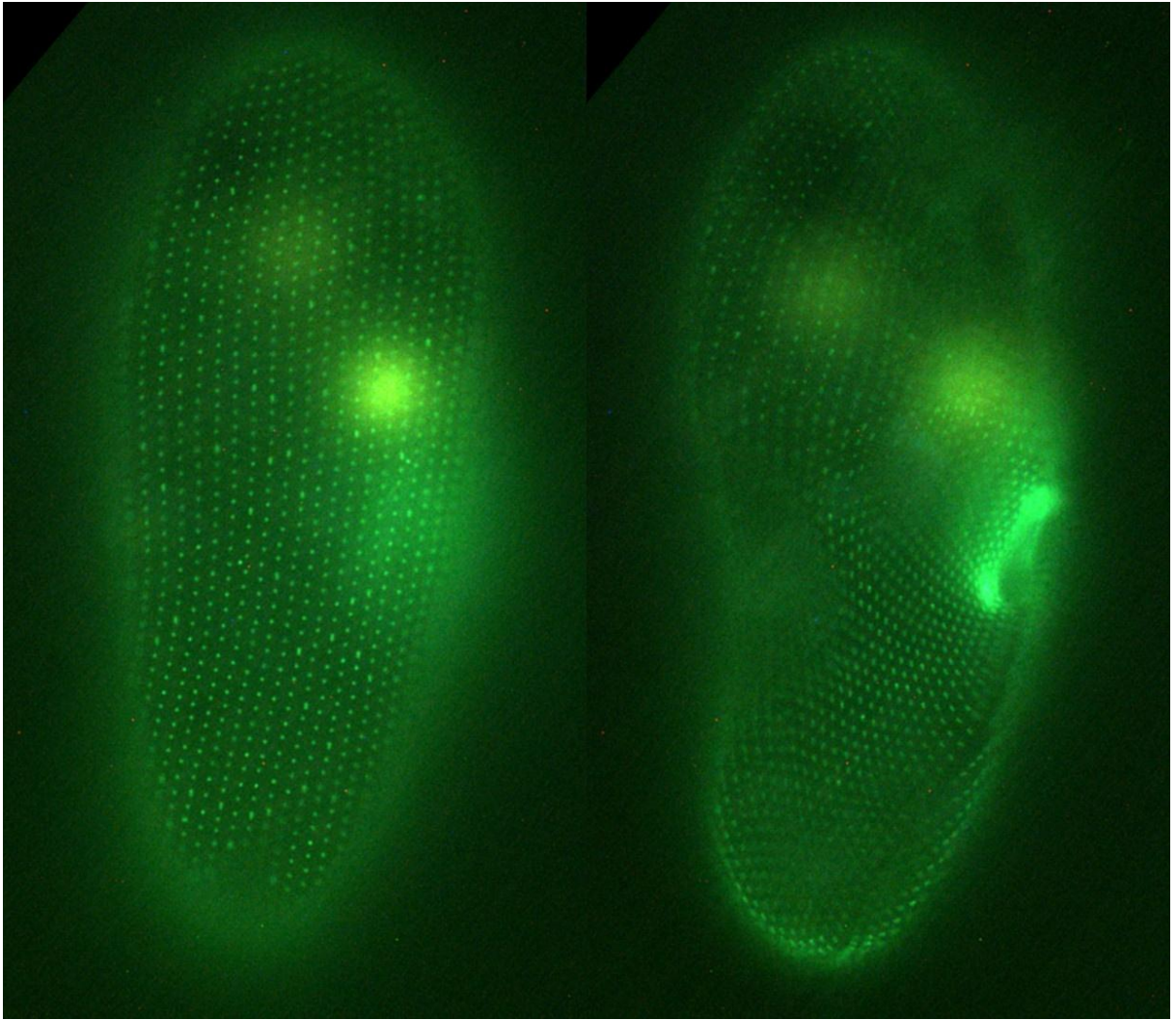
Primer Forward M13

Séquence et carte du vecteur pPXV-eGFP

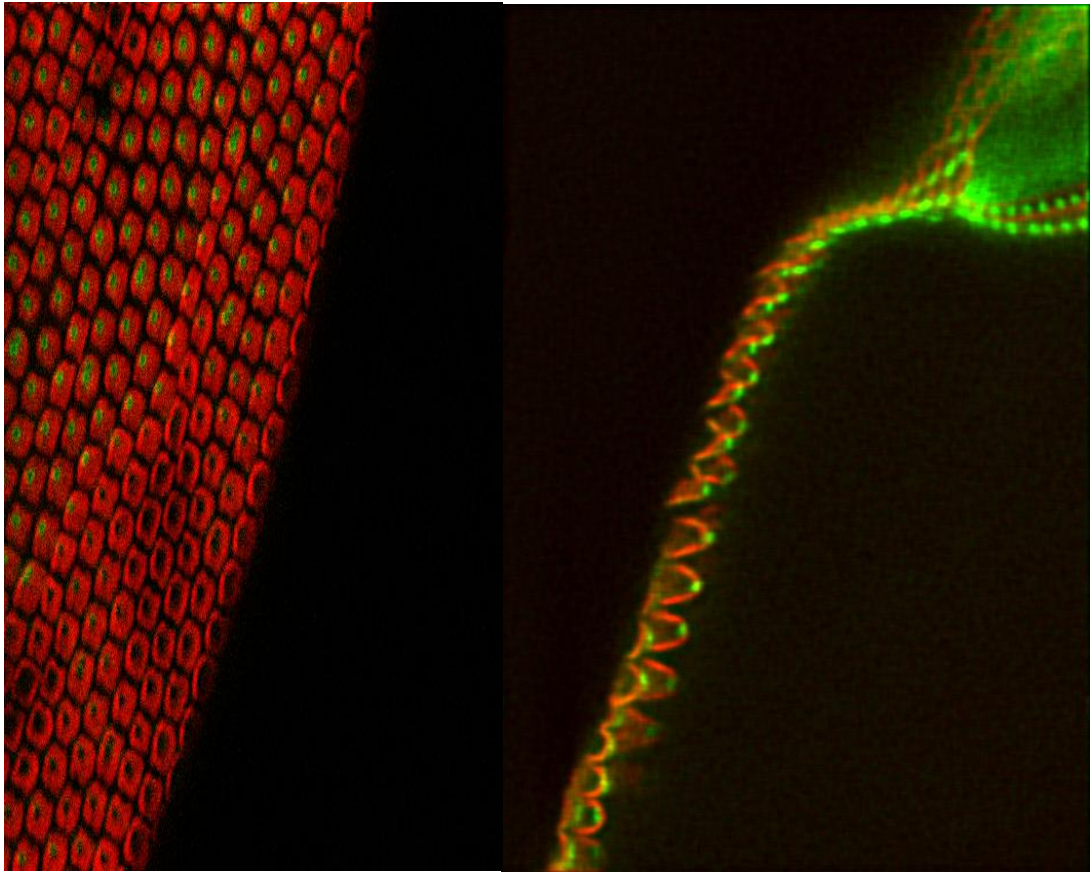
ATTATAGAATTTAAACATTTTAAACATCTTAATCATTTCATAAATAACTAAAAATCAAAGTATTACATCAATAAAT
AACTTTTACTCAATGTCAAAGAATTATTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
GTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG
TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTT
TGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGGTT
GGGGTTGGGAAAACAGCATTAGGATTAGAAGAATATCCTGATTAGGTTGAAAATATTGTTGATGCGCGGGAT
CGCGGCCGCTAGGCCGATCCGCTGCACGGTCTGTTCCCTAGCATGTACGTGAGCGTATTTCTTTTAAACCA
CGACGCTTTGTCTTCATTCAACGTTTCCCATTTGTTTTTCTACTATTGCTTTGCTGTGGGAAAACTTATCGAA
AGATGACGACTTTTTCTTAATTCTCGTTTTAAGAGCTTGGTGAGCGCTAGGAGTCACTGCCAGGTATCGTTTGA
ACACGGCATTAGTCAGGGAAGTCATAACACAGTCTTTCCCGCAATTTCTTTTTCTATGAACGAGGCGCGCTT
TCCTTTTTCTTTTTGCTTTTTCTTTTTTTTTCTCTTGAACCTCGATCGAGAAAAAATATAAAAGAGATGGAGG
AACGGGAAAAAGTTAGTTGTGGTGATAGGTGGCAAGTGGTATTCCGTAAGAACAACAAGAAAAGCATTTCATA
TTATGGCTGAACGAGCAACAAGTGCAAAATTTAAGCATCAACGACAACAACGAGAATGGTTATGTTCTCTCC
TCACTTAAGAGGAAAAACCAAGAAGTGCCAGAAAATAACATGAGCAACTACAATAACAACAACGGCGGCTACAA
CGGTGGCCGTGGCGGTGGCAGCTTCTTAGCAACAACCGTCGTGGTGTACGGCAACGGTGGTTTCTTCGGTG
GAAACAACGGTGGCAGCAGATCTAACGGCCGTTCTGGTGGTAGATGGATCGATGGCAAACATGTCCCAGCTCC
AAGAAACGAAAAGGCCGAGATCGCCATATTTGGTGTCCCGGAGGATCGCGGCCGCTAGGCCGATCCCGCGCA
TCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGAATGCTGTTTTCCACCCCAACCCCAACCCCA
AACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCA
ACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCA
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
CCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAC
ATACTTTGATTTTAGTTATTTATGAATGATTAAGATGTTAAAATGTTTAAATCTATAATATTAACGCTTACAA
TTTCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
TGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA
AACGACGGCCAGTGAGCGCGTAGTGTATTACTCCAATACTTTATGTTGTGAAATCCATATGATGTCTATGTA
TTGTTTGACATAAGTATAAAAAATAAAAAATAAGTAATTAGAAAATTCGAGATTTATTTAAATATAAGTACG
TTCTTTAATTTATATTTATTTAAGTGTGTTCATTTAGATAAGGGTACCTCTGAGGCCTCACTTGTATAGTTCATC
CATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCTGTACAACTCAAGAAGGACCATGTGGTCTCTCTTTTCGTTGGGATCTT
TCGAAAGGGCAGATTGTGTGGACAGGTAATGGTTGTCTGGTAAAAGGACAGGGCCATCGCCAATTGGAGTATT
TTGTTGATAATGGTCTGCTAGTTGAACGCTTCCATCTTCAATGTTGTGTCTAATTTTGAAGTTAACTTTGATTCC
ATTCTTTTGTGTGCTGCCATGATGTATACATTGTGTGAGTTATAGTTGTATTCCAATTTGTGTCCAAGAATGTTT
CCATCTTCTTTAAATCAATACCTTTTAACTCGATTCTATTAACAAGGGTATCACCTTCAAACCTTGACTTCAGCA
CGTGCTTGTAGTTCCCGTCATCTTTGAAAAATATAGTTCTTTTCTGTACATAACCTTCGGGCATGGCACTCTTG
AAAAAGTCATGCCGTTTCATATGATCTGGGTATCTTGAAGGATTGAACACCATAAGTTAACGTAGTGACAA
GTGTTGGCCATGGAACAGGTAGTTTTCCAGTAGTGCAATAAATTTAAGGGTAAGTTTTCCGTATGTTGCATCA
CCTTCACCTCTCCACTGACAGAAAAATTTGTGCCCATTAACATCACCATCTAATTCACAAGAATTGGGACAAC
TCCAGTGAAAAAGTTCTTCTCTTTACCCATATTATTGGTACCTCGAGTCTAGATTACTAGTTGATTTATTTAATT
AATGATTTGATACTTAGATAATTGACTTATAAATCAAATTTGAATTTAACAAGCATATTTACAAAACACAAAA
AAGCAATTAATTAATTATAAGAATTCATAAGAAAATTTATAATGCAATAATATTGGAATACATATCCTAATAT
CATTATATTCATTATCTTAATAATATGAAATGATAATCTAAACCAAAGAATAACTGATTCTGATAGTTTTTG
CAAAGCAATATTAATTTCTTTGAAAAATTTCAATTTTTCTTTAACTTATGTTGTATCTGAAGATCATTCCTATAT
CCTTTAAGTTGAATTCATGGAGTTTAAATGGTAAATTTCACTTATTATCACAATTGATTTATAAAGAATTGAAA
ACGAATGAATAATTCTAATTGCCATTTAAAATAATTTCTTACAAAGAAAAATGTATATAAAAAGGTTTCAAG
GGTTATAATTAACCTACTGTTTGATATTTTTTCTTATTTACTTTTTTCCATTTCCAATCAGCATTATATTGAATT
TATAAATATTTTCTGATACTAAACGTTTGATGTATTTATGCCTCTATAATGTTCTTATCAAACACAATAACTTG
TGTTTATCTGGAAATTTCTAGAAAAACATACTTCAGCTTAACTCAGAAATTTTTCTTAAACATAAGAATAT
AACTTAATAAAATCAAGTCTTAATTTAATAAAGTAGAATCCTAATATAAATTATTAATCTTATCTTCTGAGCTC
CGGAACAGTTTTTCTGCTTCCGTATCCTTACCCAGGCTGTGCCGTTCCACTTCTGATATTTCCCTCCCGGCGAT
AACCAGGTAAATTTTCCGTAACGGACCGAGTTTCAAGAAATAAATAACGCGGGATCCCTTGGCGTAATCATGG
TCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
TAAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGTTTCCAGTCGG
GAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGG

CGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG
 CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAA
 TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
 CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG
 CTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
 ACCCCCCGTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACT
 TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT
 GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT
 TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAG
 CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
 GGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAAT
 TAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAG
 TGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTAC
 GATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGAT
 TTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCC
 AGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATT
 GCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCG GTTCCCAACGATCAAGGCG
 AGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCTTCGGTCTCCGATCGTTGT CAGAAGTAAGT
 TGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGT CATGCCATCCGTAAGATGC
 TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
 GCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGA AAACGTTCTTCG
 GGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCA ACTGATC
 TTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA AAGGGA
 ATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAAT





Localisation de la Pcar fusionnée à la GFP. La Pcar fusionnée à la GFP se localise au niveau des corps basaux.

A**B**

A- Vue tangentielle de la paramécie où on voit la localisation de la Pcar fusionnée à la GFP (en vert), ce même clone a été décoré par un anticorps monoclonal le CTS32 (rouge). B- Coupe transversale au microscope confocal effectué sur ce clone.



Localisation de la Pcar-GFP. Marquage à l'or avec un anticorps anti-GFP d'une coupe longitudinale du cinétosome vue en microscopie électronique. On voit des grains d'or dans la partie qui est à la jonction entre l'épiplasme et le corps basal, on voit également des grains d'or à la base du corps basal.

**Article Soumis pour publication dans
BMC Evolutionary Biology**